



Universitätsklinikum
Jena

HOCHSCHULE
MITTWEIDA
UNIVERSITY OF
APPLIED SCIENCES



BACHELOR- ARBEIT

Frau
Alicia Vogler

***Analyse von intratumoralen
Immunzellpopulationen bei
p53-AAK positiven bzw. negativen
Ovarialkarzinompatientinnen***

Mittweida, 2014

BACHELORARBEIT-ARBEIT

***Analyse von intratumoralen
Immunzellpopulationen bei p53-AAK
positiven bzw. negativen
Ovarialkarzinompatientinnen***

Autor:

Frau

Alicia Vogler

Studiengang:

Biotechnologie/Bioinformatik

Seminargruppe:

BI10w1-B

Erstprüfer:

Prof. Dr. rer. nat. habil. Röbbbe Wünschiers

Zweitprüfer:

Dr. Norman Häfner

Betreuer am Universitätsklinikum Jena:

Dr. Norman Häfner

Einreichung:

Mittwoch, 15.10.2014

Verteidigung/Bewertung:

Mittweida, 2014

Bibliographische Beschreibung:

Vogler, Alicia: Analyse von intratumoralen Immunzellpopulationen bei p53-AAK positiven bzw. negativen Ovarialkarzinompatientinnen. - 2014. – I-X, 1-202.

Mittweida, Hochschule Mittweida, Fakultät Mathematik/ Naturwissenschaften/Informatik, Bachelor-Arbeit, 2014

Englischer Titel

Analysis of intratumoral immune cell populations in p53-aab-positive and -negative ovarian cancer patients.

Kurzbeschreibung

Ovarialkarzinome weisen häufig Mutationen innerhalb des Tumorsuppressorgens p53 auf, auf die das menschliche Immunsystem mit Autoantikörpern reagiert. Aber nicht alle Patienten bilden diese Autoantikörper. Warum das so ist, haben Forscher noch nicht herausgefunden. Diese Arbeit versucht eine Korrelation zwischen Immunzellpopulationen und Autoantikörper-Status zu finden.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Gynäkologische Molekularbiologie der Universitätsfrauenklinik, Jena bedanken. Ich habe mich während des Praktikums sehr wohl gefühlt und möchte mich für die Aufgeschlossenheit und Hilfsbereitschaft bei dem gesamten Kollegium bedanken. Dem Leiter der Forschungsgruppe Prof. Dr. Mathias Dürst möchte ich für die Möglichkeit der Erstellung der Bachelor-Arbeit danken. Ein besonderer Dank gilt Dr. Norman Häfner, der mir mit seinem Wissen und seinen Fähigkeiten immer zur Seite stand und von dem ich sehr viel lernen konnte.

Außerdem möchte ich mich bei Prof. Dr. Röbbke Wünschiers für die wunderbare Betreuung über das gesamte Studium hinweg bedanken.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-------------|
| Inhaltsverzeichnis..... | I |
| Abbildungsverzeichnis | IV |
| Tabellenverzeichnis..... | VI |
| Abkürzungsverzeichnis..... | VIII |
| 1 Einleitung..... | 1 |
| 1.1 Eierstockkrebs..... | 3 |
| 1.1.1 Ovarien | 3 |
| 1.1.2 Epidemiologie..... | 7 |
| 1.1.3 Ätiologie | 10 |
| 1.1.4 Kanzerogenese | 13 |
| 1.1.5 Klassifikation der Ovarialtumoren | 17 |
| 1.1.6 Histologische Klassifikation des epithelialen Ovarialkarzinoms | 19 |
| 1.2 Das TP53-Gen..... | 22 |
| 1.2.1 p53 und Ovarialkarzinome | 26 |
| 1.2.2 p53-Autoantikörper (p53-AAK) | 27 |
| 1.3 Epigenetik – DNA-Methylierung..... | 28 |
| 2 Zielstellung | 31 |
| 3 Material | 32 |
| 3.1 Geräte und Materialien..... | 32 |
| 3.2 Chemikalien und Farbstoffe | 34 |
| 3.3 Lösungen und Puffer | 36 |
| 3.4 molekularbiologische Reagenzien | 39 |
| 3.5 Enzyme, Plasmide, DNA-Standards, Antikörper, Nukleinsäuren..... | 39 |
| 3.6 Primer | 41 |
| 3.7 Plasmide | 42 |
| 3.8 Medien..... | 43 |
| 3.9 Zelllinien | 43 |
| 3.10 Kits | 43 |
| 3.11 Probenmaterial | 44 |
| 3.12 Software | 44 |
| 4 Methoden..... | 45 |
| 4.1 Immunhistochemische/Immunzytochemische Färbung von Gefrierschnitten | 45 |
| 4.1.1 Vorbereitung der Lösungen..... | 45 |
| 4.1.2 Vorbereitung der Gefrierschnitte..... | 46 |
| 4.1.3 Färbeverfahren..... | 47 |

| | |
|---|-----------|
| 4.1.4 Gegenfärbung der Zellkerne..... | 48 |
| 4.1.5 Hämatoxylin-Eosin-Färbung | 48 |
| 4.2 Arbeiten mit Bakterien..... | 50 |
| 4.2.1 Klonierung/Ligation des PCR-Produkts – Generierung rekombinanter Plasmide | 50 |
| 4.2.3 Transformation von <i>Escherichia coli</i> (JM 101)..... | 51 |
| 4.2.4 Blau-Weiß-Selektion | 52 |
| 4.2.5 Plasmid-Mini-Preparationen | 53 |
| 4.2.5.1 modifiziert nach Birnboim, H.C. (Birnboim 1983) | 53 |
| 4.2.5.2 Plasmid-Mini-Kit | 54 |
| 4.2.6 Kulturtechniken von <i>Escherichia coli</i> | 56 |
| 4.3 Arbeiten mit DNA..... | 57 |
| 4.3.1 DNA-Isolation und DNA-Aufreinigung | 57 |
| 4.3.1.1 Phenol-/Chloroform-/Isoamylalkohol-Aufreinigung und Ethanol-Fällung (PCI) | 58 |
| 4.3.1.2 Plasmid-DNA Aufreinigung aus Reaktionen..... | 61 |
| 4.3.1.3 Gelextraktion von DNA-Fragmenten | 62 |
| 4.3.2 Agarose-Gelelektrophorese | 63 |
| 4.3.3 Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung der DNA | 64 |
| 4.3.4 Vervielfältigung von DNA – Polymerasekettenreaktion (PCR) | 65 |
| 4.3.4.1 Standard-PCR nach Kary Mullis | 65 |
| 4.3.4.2 quantitative Real-Time-PCR (qPCR) | 71 |
| 4.3.5 Restriktion | 74 |
| 4.3.5.1 allgemeines Prinzip | 74 |
| 4.3.5.2 Restriktionsanalyse zur Überprüfung verschiedener Parameter | 75 |
| 4.3.6 Sequenzierung..... | 79 |
| 4.3.6.1 Allgemeines Prinzip der Sanger-Sequenzierung | 79 |
| 4.3.6.2 Sequenzierungsanalyse in einem externen Sequenzier-Labor (SeqLab) | 79 |
| 4.3.7 Methylierungsanalyse | 80 |
| 4.3.7.1 Methylierung der Plasmid-DNA (Kontroll-Plasmid)..... | 80 |
| 4.3.7.2 Bisulfit-Behandlung der DNA..... | 81 |
| 4.3.7.3 Prinzip der Methylierungsspezifischen PCR (MSP) | 84 |
| 4.4 Arbeiten mit RNA | 86 |
| 4.4.1 RNA-Isolation und –Aufreinigung..... | 86 |
| 4.4.2 Reverse-Transkription – cDNA-Synthese..... | 89 |
| 4.4.3 quantitative Real-Time-PCR (qPCR)..... | 90 |
| 5 Ergebnisse..... | 94 |
| 5.1 Immunhistochemie/Immunzytochemie | 94 |
| 5.1.1 Anfärbung von zytotoxischen T-Zellen mit dem CD8-Primärantikörper | 100 |

| | |
|---|------------|
| 5.1.2 Anfärbung von Makrophagen mit dem CD163-Primärantikörper | 104 |
| 5.1.3 Immunzell-Verhältnisse (innerhalb der Population sowie zwischen den Populationen) | 109 |
| 5.2 Validierung IHC-Daten – Methylierungsanalysen FoxP3-Genabschnitt | 111 |
| 5.2.1 Sequenzierung der generierten Kontroll-Plasmide | 111 |
| 5.2.2 Restriktionsanalysen am generierten Kontroll-Plasmid | 112 |
| 5.2.3 Etablierung von Methylierungsanalysen des FoxP3-Gens mittels MSP | 115 |
| 5.2.4 Methylierungsanalysen des FoxP3-Genabschnittes mithilfe der qPCR (klinische Proben) | 132 |
| 5.3 Validierung IHC-Daten – Genexpressionsanalyse CD8-Antigen | 144 |
| 5.3.1 Überprüfung der Primerspezifität | 145 |
| 5.3.2 Austesten verschiedener Annealing-Temperaturen | 147 |
| 5.3.3 Genexpressionsanalyse an den klinischen Proben | 149 |
| 6 Diskussion | 158 |
| 6.1 Immunhistochemie | 158 |
| 6.2 Methylierungsanalyse des FoxP3-Promotorbereichs | 159 |
| 6.3 Genexpressionsanalyse des Genabschnitts des CD8-Gens | 162 |
| 7 Ausblick | 163 |
| 8 Zusammenfassung | 165 |
| Literaturverzeichnis | 167 |
| Anhang | 177 |
| Selbstständigkeitserklärung | 202 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|-----|
| Abbildung 1 weibliches Reproduktionssystem (oben) [URL-4] geä. nach [URL-5]; Aufbau menschl. Ovar (unten) [URL-6] | 3 |
| Abbildung 2 menschliches Ovar, Rindenregion (halbschematische Zeichnung nach Originalschnitten) | 6 |
| Abbildung 3 Altersspezifische Erkrankungsraten, ICD-10 C56, Deutschland 2009-2010 [URL-9] | 8 |
| Abbildung 4 Verteilung der T-Stadien bei Erstdiagnose, Dtl. 2009-2010, ICD-10 C56 [URL-9] | 9 |
| Abbildung 5 Erkrankungs- und Sterberaten (links); Absolute Zahl der Neuerkrankungs- u. Sterbefälle (rechts), | 10 |
| Abbildung 6 Modell der ovariellen Karzinogenese | 15 |
| Abbildung 7 verschiedene Ovarialtumore stammen von unterschiedlichen Zell-Subtypen | 17 |
| Abbildung 8 Ursprung und histologische Subtypen assoziiert mit der molekularen Klassifizierung nach Typ I und II [Romero I and Bast RC, 2012] | 19 |
| Abbildung 9 Entwicklung einer kortikalen Einschluss-Zyste aus Eileiter-Epithel [Kurman & Shih, 2010] | 21 |
| Abbildung 10 Hypothetischer Entstehungsmechanismus für high-grade seröse pelvine Karzinome | 21 |
| Abbildung 11 struktureller p53-Aufbau | 23 |
| Abbildung 12 Konsequenzen der DNA-Methylierung [Knippers, 2006] | 29 |
| Abbildung 13 Vektor-System pGEMT | 42 |
| Abbildung 14 Plasmid pGEM-T Vector System I | 50 |
| Abbildung 15 organische Extraktion von DNA: Phasentrennung [URL-31] | 58 |
| Abbildung 16 Arbeitsschritte: Aufreinigung von PCR-Produkten aus Gelbänden | 62 |
| Abbildung 17 Schmelzkurven-Programm für die Gradienten-PCR | 70 |
| Abbildung 18 PCR-Programm für die qPCR | 73 |
| Abbildung 19 Schmelzkurven-Programm für die qPCR | 73 |
| Abbildung 20 Prinzip der Natriumbisulfit-Methode zum Nachweis von DNA-Methylierung | 82 |
| Abbildung 21 stillgelegte Gene erkennen: Methylierungs-spezifische PCR (MSP) | 85 |
| Abbildung 22 Methylierungsspezifische PCR: methylierte Cytosinreste = rot [Wagener & Müller, 2010] | 85 |
| Abbildung 23 PCR-Programm qPCR (Genexpressionsanalyse) | 91 |
| Abbildung 24 Schmelzkurven-Programm (Genexpressionsanalyse) | 91 |
| Abbildung 25 Schematischer Aufbau der Tonsilla palatina [Zilles & Tillmann, 2010] | 96 |
| Abbildung 26 Gaumenmandel | 97 |
| Abbildung 27 Färbung von Tonsillengewebe A CD8-Primärantikörper; B HE-Färbung | 98 |
| Abbildung 28 Färbung von Tonsillengewebe A CD20-Primärantikörper; B HE-Färbung | 98 |
| Abbildung 29 CD8- und HE-Färbung von drei OvCa-Gewebeproben: | 100 |
| Abbildung 30 Punkt-Diagramm: Verhältnis zytotoxischer T-Zellen (CD8) zu T-Helferzellen (CD4) im Hinblick auf den AAK-Status. | 109 |
| Abbildung 31 Punkt-Diagramm: Verhältnis zwischen zytotoxischen T-Zellen (CD8) innerhalb des Tumors und des Stromas im Hinblick auf den AAK-Status | 110 |
| Abbildung 32 Agarose-Gelbild Restriktionsanalysen (Not I und Taq-alphaI) | 112 |
| Abbildung 33 Agarose-Gelbild: 2-fach Methylierung Kontroll-Plasmide und Not I-Verdau | 114 |
| Abbildung 34 Methylierungsanalyse - Primer-Spezifität: Schmelzkurve M-qPCR: | 116 |
| Abbildung 35 Methylierungsanalyse - Primer-Spezifität: Schmelzkurve NM-qPCR: | 117 |
| Abbildung 36 Agarose-Gelbild: Methylierungsanalyse - Primer-Spezifität | 118 |
| Abbildung 37 Primervalidierung an Kontroll-Plasmiden: M-qPCR (Schmelzkurve) | 120 |
| Abbildung 38 Entstehung von Primer-Dimeren während der methylierungsspezifischen qPCR (Schmelzkurve) | 121 |
| Abbildung 39 Primervalidierung an Kontroll-Plasmiden: NM-qPCR (Schmelzkurve) | 121 |
| Abbildung 40 Agarose-Gelbild: Primervalidierung an Kontroll-Plasmiden | 122 |
| Abbildung 41 Methylierungsanalyse: Gradient: M-PCR | 124 |

| | |
|--|-----|
| Abbildung 42 Methylierungsanalyse: Gradient: NM-PCR..... | 125 |
| Abbildung 43 Gelbild: Austesten verschiedener Primer-Konzentrationen (NM-qPCR) | 128 |
| Abbildung 44 Methylierungsanalyse: Amplifikationsplots klinische Proben u. Kontrollen..... | 135 |
| Abbildung 45 Amplifikationsplot: Beta-Aktin (klinische Proben, Kontrollen: Abstrich-DNA u. aqua dest.)..... | 136 |
| Abbildung 46 Agarose-Gelbild der NM-qPCR (klinische Proben) | 140 |
| Abbildung 47 Schmelzkurve: Amplifikation mit CD8-Primerpaar | 145 |
| Abbildung 48 Agarose-Gelbild: Genexpressionsanalyse Austesten der Primer-Spezifität..... | 146 |
| Abbildung 49 Schmelzkurve: Amplifikation mit dem GAPDH3'-Primerpaar..... | 147 |
| Abbildung 50 Agarose-Gelbild: Genexpressionsanalyse Austesten verschiedener Annealing-Temperaturen | 148 |
| Abbildung 51 Amplifikationsplot: klinische Proben Genexpressionsdaten | 151 |
| Abbildung 52 Überprüfung einer Korrelation zwischen IHC-Daten und Genexpressionsanalyse..... | 154 |
| Abbildung 53 immunhistochemische Färbung (gesamtes Färbungsset) an einer OvCa-Gewebeprobe: | 177 |
| Abbildung 54 Immunzell-Verhältnis: CD4 zu FoxP3 | 178 |
| Abbildung 55 Immunzell-Verhältnis: CD4 zu CD163..... | 178 |
| Abbildung 56 Immunzell-Verhältnis: CD4 zu CD20..... | 179 |
| Abbildung 57 Immunzell-Verhältnis: CD8 zu FoxP3 | 179 |
| Abbildung 58 Immunzell-Verhältnis: CD8 zu CD163..... | 180 |
| Abbildung 59 Immunzell-Verhältnis: CD8 zu CD20..... | 180 |
| Abbildung 60 Immunzell-Verhältnis: FoxP3 zu CD163 | 181 |
| Abbildung 61 Immunzell-Verhältnis: FoxP3 zu CD20 | 181 |
| Abbildung 62 Immunzell-Verhältnis: CD20 zu CD163..... | 182 |
| Abbildung 63 Verhältnis Tumor - Stroma: T-Helferzellen..... | 183 |
| Abbildung 64 Verhältnis Tumor - Stroma: regulatorische T-Zellen | 183 |
| Abbildung 65 Verhältnis Tumor - Stroma: Makrophagen..... | 184 |
| Abbildung 66 Verhältnis Tumor - Stroma: B-Zellen | 184 |
| Abbildung 67 Schmelzkurve Gradienten-PCR (M-PCR): | 187 |
| Abbildung 68 Schmelzkurve Gradienten-PCR (NM-PCR): | 187 |
| Abbildung 69 Schmelzkurve Primer-Konzentrationen (NM-qPCR):..... | 188 |
| Abbildung 70 Schmelzkurve: M-qPCR (klinische Proben)..... | 188 |
| Abbildung 71 Schmelzkurve: M-qPCR (Verdünnungsreihe u. Wasserkontrolle) | 189 |
| Abbildung 72 Schmelzkurve: NM-qPCR (klinische Proben) | 189 |
| Abbildung 73 Schmelzkurve: NM-qRT-PCR (Verdünnungsreihe u. Wasserkontrolle)..... | 190 |
| Abbildung 74 Schmelzkurve: Beta-Aktin qPCR (gesamtes Probenstet: klinische Proben, Verdünnungsreihe u. Wasserkontrolle) | 190 |
| Abbildung 75 Schmelzkurve Annealing-Temperatur 58°C: aqua dest. (rot), A2780 (blau), klinische Probe 8265 (grün) | 191 |
| Abbildung 76 Schmelzkurve Annealing-Temperatur 60°C: aqua dest. (rot), A2780 (blau), klinische Probe 8265 (grün) | 192 |
| Abbildung 77 Schmelzkurve Annealing-Temperatur 62°C: aqua dest. (rot), A2780 (blau), klinische Probe 8265 (grün) | 192 |
| Abbildung 78 Schmelzkurve Annealing-Temperatur 63,5°C: aqua dest. (rot), A2780 (blau), klinische Probe 8265 (grün) | 192 |
| Abbildung 79 Schmelzkurve Annealing-Temperatur 65,4°C: aqua dest. (rot), A2780 (blau), klinische Probe 8265 (grün) | 193 |
| Abbildung 80 Genexpressionsdaten in Abhängigkeit von den IHC-Daten (CD8+ Zellen im Tumorbereich) | 193 |
| Abbildung 81 Genexpressionsdaten in Abhängigkeit von den IHC-Daten (CD8+ Zellen im Stromabereich) | 194 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|-----|
| Tabelle 1 Übersicht über die wichtigsten epidemiologischen Maßzahlen für Deutschland, ICD-10 C56 [URL-9]..... | 7 |
| Tabelle 2 geschätzte Inzidenzrate nach Alter in Dtl. [URL-8]..... | 8 |
| Tabelle 3 Deutschland – geschätzte Mortalitätsrate nach Alter [URL-8]..... | 8 |
| Tabelle 4 Primärantikörper für immunhistochemische Färbung..... | 39 |
| Tabelle 5 Primer-Daten | 41 |
| Tabelle 6 Elemente des Plasmids pGEM®-T Vector System I und deren Funktion [URL-23]..... | 42 |
| Tabelle 7 Überblick Zelllinien | 43 |
| Tabelle 8 Ligationsansatz | 51 |
| Tabelle 9 Volumina Probe und aqua dest. für Ligationsansatz..... | 51 |
| Tabelle 10 Kulturtechniken <i>Escherichia coli</i> | 57 |
| Tabelle 11 Zusammensetzung des PCR-Mix für die Standard-PCR (AmpliTaQ Gold-Mix) | 67 |
| Tabelle 12 PCR-Programm Eppendorf-Cycler (Standard-PCR)..... | 67 |
| Tabelle 13 Zusammensetzung PCR-Mix (Gradienten-PCR)..... | 69 |
| Tabelle 14 PCR-Programm für die Gradienten-PCR..... | 70 |
| Tabelle 15 Zusammensetzung PCR-Mix AmpliTaQ Gold-Mix für qPCR | 72 |
| Tabelle 16 Zusammensetzung PCR-Mix FastStart Universal für qPCR | 72 |
| Tabelle 17 Überblick über die verwendeten Restriktionsendonukleasen und deren Eigenschaften [URL-40]..... | 75 |
| Tabelle 18 Restriktionsansatz für den Verdau mittels Pst I | 76 |
| Tabelle 19 Restriktionsansatz für den Verdau mittels Psi I | 76 |
| Tabelle 20 Restriktionsansatz für den Verdau mittels Not I | 77 |
| Tabelle 21 Restriktionsansatz für den Verdau mittels Taq-alpha1 | 78 |
| Tabelle 22 Zusammensetzung des Sequenzierungs-Ansatzes | 80 |
| Tabelle 23 Zusammensetzung des Methylierungsansatzes..... | 80 |
| Tabelle 24 Zusammensetzung von Master-Mix I für die Reverse Transkription..... | 89 |
| Tabelle 25 Zusammensetzung von Master-Mix II für die Reverse Transkription..... | 89 |
| Tabelle 26 Zusammensetzung qPCR für die Genexpressionsanalyse | 90 |
| Tabelle 27 Einteilung der ermittelten Daten in zwei Gruppen (M=Median der 47 Proben)..... | 102 |
| Tabelle 28 CD8-positive Zellen (Tumor) gruppiert nach AAK+/AAK- | 102 |
| Tabelle 29 Chi ² -Test und Fisher's Exact Test | 102 |
| Tabelle 30 Einteilung der ermittelten Daten in drei Gruppen | 103 |
| Tabelle 31 Gruppierungsparameter 1 und 2 (Auswertung CD163-Färbung) | 104 |
| Tabelle 32 CD163-positive Zellen (Tumor) gruppiert nach AAK+/AAK- | 105 |
| Tabelle 33 CD163-positive Zellen (Tumor) gruppiert nach AAK+/AAK- | 105 |
| Tabelle 34 CD163-positive Zellen (Stroma) gruppiert nach AAK+/AAK- | 105 |
| Tabelle 35 Chi ² -Test und Fisher's Exact Test für CD163-positive Zellen | 106 |
| Tabelle 36 Einteilung der ermittelten Daten in drei Gruppen | 106 |
| Tabelle 37 Kreuztabelle: Anzahl CD163-positiver im Tumoreal (Auswertung mittels SPSS) | 107 |
| Tabelle 38 Chi ² -Test für Tumoreal (Auswertung mittels SPSS)..... | 107 |
| Tabelle 39 Kreuztabelle: Anzahl CD163-positiver im Stromaareal (Auswertung mittels SPSS) | 108 |
| Tabelle 40 Chi ² -Test für Stromaareal (Auswertung mittels SPSS) | 108 |
| Tabelle 41 Methylierungsanalyse: Probenet für die Überprüfung der Primer-Spezifität..... | 115 |
| Tabelle 42 Probenet: Primer-Validierung – methylierungsspezifische qPCR an generierten Kontroll-Plasmiden | 119 |
| Tabelle 43 Probenet Methylierungsanalyse - Gradienten-PCR..... | 123 |

| | |
|--|-----|
| Tabelle 44 Probenet: Primer-Konzentrationen austesten | 127 |
| Tabelle 45 Zusammensetzung der verschieden-konzentrierten ausgetesteten Primer-Konzentrationen | 128 |
| Tabelle 46 serielle Plasmid-Verdünnung (Konzentrationen und Kopie-Zahlen der einzelnen Verdünnungsstufen) | 132 |
| Tabelle 47 Verdünnungsreihe aus Abstrich-DNA und Plasmid-DNA für MSP | 133 |
| Tabelle 48 Kreuztabelle: Menge unmethylierter DNA u. AAK-Status | 141 |
| Tabelle 49 Ergebnisse Chi ² -Test und Fisher's Exact Test | 141 |
| Tabelle 50 Wahrscheinlichkeiten der Chi ² -Prüfgrößen | 141 |
| Tabelle 51 Kreuztabelle: Menge unmethylierter DNA u. AAK-Status | 142 |
| Tabelle 52 Ergebnisse Chi ² -Test und Fisher's Exact Test | 142 |
| Tabelle 53 Wahrscheinlichkeiten der Chi ² -Prüfgrößen | 142 |
| Tabelle 54 Konzentrationen u. Volumina der Kontrollen, Menge aqua dest. Reverse Transkription | 145 |
| Tabelle 55 Verdünnungen CD8+ und CD8- cDNA | 149 |
| Tabelle 56 Standardreihe für Genexpressionsanalyse | 150 |
| Tabelle 57 Korrelationsanalyse zwischen CD8-positiven Zellen im Gewebe und Genexpressionsanalyse: Pearson-Chi ² -Test | 155 |
| Tabelle 58 Korrelationsanalyse zwischen CD8-positiven Zellen im Gewebe und Genexpressionsanalyse: Spearman's Rho | 156 |
| Tabelle 59 Mann-Whitney-Test | 156 |
| Tabelle 60 Immunhistochemie-Daten: gesamtes Färbungsset (klinische Proben) | 195 |
| Tabelle 61 Daten zur Analyse von FoxP3 | 198 |
| Tabelle 62 Daten zur Analyse von CD8 | 199 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------------------|---|
| AAK | Autoantikörper |
| AAK- | Autoantikörper-negativ |
| AAK+ | Autoantikörper-positiv |
| abs. HK | absolute Häufigkeit |
| aqua dest. | aqua destillata, destilliertes Wasser |
| bp | Basenpaare |
| BRCA | Breast Cancer (Brustkrebsgen) |
| CD | cluster of differentiation |
| CpG | Cytosin – Phosphat – Guanin |
| DAB | 3,3'-Diaminobenzidin |
| DAPI | 4',6-Diamidino-2-Phenylindol |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxyribonukleotidtriphosphate |
| EOC | epitheelal oavrian cancer |
| EOK | epitheliales Ovarialkarzinom |
| EtOH | Ethanol |
| FACS | Fluorescence-Activated-Cell-Sorting |
| FIGO | Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique |
| for+rev | Forward + Reverse Primer |
| FSH | Follikel-stimulierendes Hormon |
| g | Gramm |
| GnRH | Gonadotrophin |
| GOI | Gene Of Interest |
| HCl | Chlorwasserstoff (Salzsäure) |
| HE | Hämatoxylin-Eosin |
| H ₂ O ₂ | Wasserstoffperoxid |
| HRP | horseradish peroxidase, deutsch: Meerrettichperoxidase |
| IHC | Immunhistochemie |
| IPTG | Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid |
| kb | Kilo-Basenpaare |

| | |
|---------------------------|--|
| KCl | Kaliumchlorid |
| kDa | Kilodalton |
| KH_2PO_4 | Kaliumdihydrogenphosphat |
| L | Liter |
| LH | luteinisierendes Hormon |
| M | methyliert |
| LMP | low malignant potential |
| mg | Milligramm |
| mL | Milliliter |
| M-qPCR | methylierungsspezifische quantitative Real-Time PCR |
| NaCl | Natriumchlorid |
| Na_2HPO_4 | Dinatriumhydrogenorthosphat |
| NaOH | Natriumhydroxid |
| NK | Negativkontrolle |
| NM-qPCR | nicht-methylierungsspezifische quantitative Real-Time PCR |
| NM | nicht-methyliert |
| ORF | Open Reading Frame |
| PBS | Phosphatgepufferte Kochsalzlösung; phosphate buffered saline |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| PFA | Paraformaldehyd |
| qPCR | quantitative Real-Time PCR |
| qRT-PCR | quantitative Reverse Transkriptase PCR |
| RT | Raumtemperatur |
| sog. | so genannt |
| TBST | TRIS Buffered Saline + Tween |
| TE-gesättigt | Tris-EDTA gesättigt |
| TMB | 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin |
| TP | Tumorprotein |
| Treg | regulatorische T-Zelle |
| U/mL | Units pro Milliliter |
| X-Gal | 5-Chlor-4-Brom-3-indolyl- β -D-Glactosid |

| | |
|-------|---------------------------------|
| TRIS | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| U | Units |
| µg/µl | Mikrogramm/Mikroliter |

1 Einleitung

Eierstockkrebs ist eine bösartige Krebserkrankung der weiblichen Keimdrüsen (Eierstöcke, Ovarien). Der größte Teil der bösartigen Eierstocktumoren beruhen auf einer malignen Transformation der Zellen der Eierstockhülle (Oberflächenepithel). Diese Form der ovariellen Tumoren wird als Ovarialkarzinom bezeichnet. Weitaus seltener leiten sich die Neoplasien aus den hormonproduzierenden Zellen oder den Keimzellen in den Ovarien ab.

[URL-1] [URL-2]

Die Krankheit wird in frühen Phasen nicht erkannt, da sie während dieser Phase symptomlos unentdeckt bleibt. Daher besteht auch noch kein Früherkennungssystem für Eierstockkrebs. 70% der diagnostizierten Fälle weisen eine fortgeschrittene Erkrankung auf, bei denen die 5-Jahres-Überlebensrate bei unter 30% liegt. [Kurman et al., 2008]

Trotz zahlreicher Fortschritte bei der Durchführung radikaler Operationen und zytotoxischer Chemotherapien, hat sich das Gesamt-Überleben in mehr als 50 Jahren nicht verbessert. [Kurman & Shih, 2011] Das liegt daran, dass bei Diagnosestellung fast immer weitere Organe neben den Ovarien von der Krebserkrankung betroffen sind. [Seidman, Cho & Ronnett et al., (2011)]

Das schlechte Verhältnis von Überleben zu Neuerkrankungsrate (Inzidenz) beim epithelialen Ovarialkarzinom (EOK) resultiert aus einem hohen Prozentsatz von Fällen, die in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert werden. [Jemal et al., 2007] Die Schwierigkeit der Beschreibung früherer Ereignisse in der Eierstock-Kanzerogenese liegt in einer limitierten Verfügbarkeit von Tumoren in frühen Entwicklungsphasen, der Krankheits-Heterogenität zwischen den Individuen und der genetischen Instabilität des Tumors. Dadurch wird es schwierig zu erkennen, ob sich detektierte Mutationen in frühen oder späten Phasen entwickeln. [Landen et al., 2008] Tumore der Ovarien treten sehr heterogen auf und verfügen über ein großes Spektrum von Stadien. [Shih & Kurman, 2004] Primäre Karzinome im Bauchraum werden oft fälschlicherweise dem Eierstockkrebs zugeordnet. [Kindelberger et al., 2007]

Die Standardbehandlung besteht aus Operation und einer adjuvanten Kombinationstherapie aus den Chemotherapeutika Carboplatin und Paclitaxel. Trotz anfänglichem Ansprechen von 80% der Patientinnen, entwickeln die meisten Frauen ein Rezidiv, aufgrund einer erworbenen Resistenz gegenüber der angewandten Chemotherapie. [Kurman et al., 2008]

Viele Schwangerschaften und ausgedehnte Stillzeiten verringern das Risiko an Eierstockkrebs zu erkranken. [Riman, 2002; Gwinn et al., 1990] Die Einnahme oraler Kontrazeptiva über einen Zeitraum von fünf Jahren oder länger, verringert die Zahl der Ovulationen und reduziert die Gefahr einer Eierstockkrebs-Erkrankung um 50%. Frauen mit einer familiären Vorbelastung bezüglich Eierstockkrebs und bei denen eine Mutation in den BRCA-Genen gefunden wurde, haben die Möglichkeit sich einer prophylaktischen Hysterektomie oder einer bilateralen Salpingo-Oophorektomie zu unterziehen. [Kurman & Shih, 2011; Permuth-Wey & Sellers, 2009]

1.1 Eierstockkrebs

1.1.1 Ovarien

Die weiblichen Geschlechtsorgane bestehen aus den paarigen Ovarien (Eierstöcke), den paarigen Tuben (Eileiter, Tubae uterinae), dem Uterus (Gebärmutter), der Vagina (Scheide) und der Vulva (äußeres Genital). Das Ovar ist ein paariges Organ, welches intraperitoneal im kleinen Becken (Pelvis minor) in einer kleinen Gewebevertiefung (Fossa ovarica) liegt (siehe Abbildung 1). Die Aufgabe der Ovarien ist während der Geschlechtsreife die Bereitstellung von befruchtbaren (reifen) Eizellen (Oozyten) und die Produktion und Sekretion weiblicher Geschlechts-/Sexualhormone. [Rüllmann-Rauch R., 2009][URL-3]

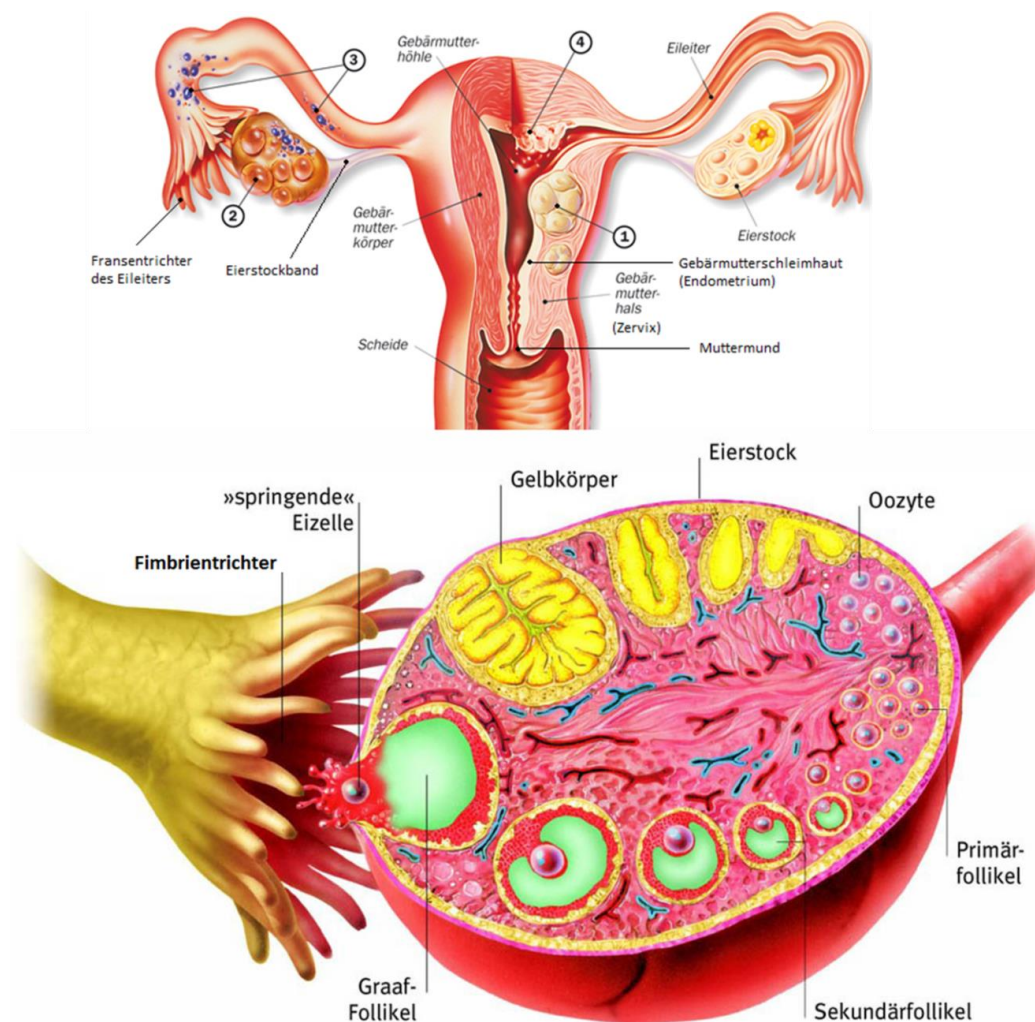


Abbildung 1 weibliches Reproductionssystem (oben) [URL-4] geä. nach [URL-5]; Aufbau menschl. Ovar (unten) [URL-6]
 1 Myome (gutartige und zumeist rundliche Geschwülste im Muskelkörper der Gebärmutter), 2 Ovarialzyste, 3 Endometriose (gutartige chronische Wucherung der Gebärmutter Schleimhaut), 4 Karzinom (bösartiger epithelialer Tumor an den Eierstöcken oder der Gebärmutter)

Ovarien geschlechtsreifer Frauen sind mandelförmig und weisen zu beiden Seiten eine konvex verlaufende Form auf. Ihre Größe umfasst, in Abhängigkeit von physiologischen Verhältnissen und Lebensalter, in der Länge 2,5-5 cm, in der Breite 1,5-3 cm und in der Dicke 0,6-1,5 cm. Der Eierstock ist an der seitlichen Beckenwand lokalisiert und befindet sich an der Kreuzungsstelle des Uterus mit den großen Beckengefäßen. Dabei liegt er etwas unterhalb der Linea terminalis. Der Eierstock wird durch das Mesovarium (Duplikatur des Ligamentum latum), das Ligamentum Suspensorium ovarii und das Ligamentum ovarii proprium gehalten. Das Organ ist im Bereich der Aufzweigung der Arteria iliaca communis bzw. Vena iliaca communis lokalisiert. Die Pole jedes einzelnen Eierstocks werden als Extremitas tubaria (laterokraniel) und Extremitas uterina (mediokaudal) bezeichnet. An der Extremitas tubaria ist der laterale Pol des Eierstocks über das Ligamentum Suspensorium ovarii mit der seitlichen Beckenwand verbunden. An der Extremitas uterina fixiert das Ligamentum ovarii proprium den medialen Pol des Ovariums an der Seitenkante des Uterus. [Bumm E.; Döderlein A.; Krönig B.; Menge C., 1912] [URL-3] Mit der proximalen (der Körpermitte zu gelegen; [URL-7] Fläche ist er an das Mesovarium angebracht. [Bumm E.; Döderlein A.; Krönig B.; Menge C., 1912] Am vorderen Rand des Ovars (Margo), der als Margo mesovaricus bezeichnet wird, setzt das Mesovar an. Im Gegensatz dazu wird der gegenüberliegende Rand als Margo liber bezeichnet und befindet sich in dorsokaudaler Richtung. [URL-3] Durch diese Apparatur aus Haltebändern wird die Beweglichkeit des Ovariums beschränkt und es verharrt bei verschiedenen Körperhaltungen in seiner Lage. Die Ovarien liegen bei jugendlichen Mädchen (bis zur Zeit der beginnenden Geschlechtsreife) fast glatt und eben vor. Mit fortschreitendem Alter wird die Oberfläche durch Eireifung und Eiberstung aufgrund zahlreicher narbiger Einziehungen höckerig. [Bumm E.; Döderlein A.; Krönig B.; Menge C., 1912] Das Ovar entwickelt sich in der Genitalleiste, wobei innerhalb der 5./6. Embryonalwoche Urkeimzellen in diese einwandern und sich in den Keimsträngen (Epithelstränge) ansiedeln. Die Keimstränge stammen einerseits von einwachsendem Zölomepithel und andererseits von Resten der Urniere und stellen die Vorläufer des Follikelepithels dar. Tuben, Uterus und Vagina entstehen aus dem Müller-Gang. Die morphologischen Korrelate umfassen Follikel, die eine Einheit aus Oozyten und umgebenden somatischen Zellen darstellen, und dem Corpus luteum, der der Nachfolger des gesprungenen Follikels ist (Gelbkörper). Diese beiden Strukturen bestimmen abwechselnd die Ovar-Funktion innerhalb des ovariellen Zyklus. Die präovulatorische Zyklushälfte (sog. Follikelphase) wird bestimmt durch das rasche Wachstum der Follikel. Diese produzieren Estrogene. Die postovulatorische Zyklushälfte (sog. Lutealphase) wird dominiert vom Corpus

luteum, welches das Gestagen Progesteron sezerniert. Der Zyklus wird gesteuert durch die hypophysären Gonatropine FSH (Follikel-stimulierendes Hormon) und LH (Luteinisierendes Hormon) sowie indirekt vom hypothalamischen Steuerhormon GnRH (Gonadoliberin). [Rüllmann-Rauch R., 2009] Durch reifende oder untergehende Eifollikel zeigen sich rundliche Vorbuckelungen oder narbige Schrumpfung auf der Ovar-Oberfläche. Im Ultraschall zeigen sie sich als ovaläre Strukturen, innerhalb derer verschiedene Follikel-Reifestadien differenzierbar sind. [Nauth H. F., 2002]

Das adulte Ovar ist histologisch aus der im Zentrum liegenden Markregion (Ovarialmark, Medulla ovarii), der äußeren Rindenregion (Ovarialrinde, Cortex ovarii) und dem Deckepithel aufgebaut (siehe Abbildung 2). [Bubendorf L.; Feichter G. E.; Obermann E. C.; Dalquen P., 2011] [Nauth H. F., 2002]

Das Ovar besitzt auf der Ovar-Oberfläche das Peritonealepithel (Oberflächenepithel, Mesothel), welches bei jungen Frauen eine kubische Form hat. Darunter schließt sich eine schmale Bindegewebsschicht an – die *Tunica albuginea*. Diese wird von diesen kuboiden Zellen umschlossen, die das Keimepithel bilden. [Rüllmann-Rauch R., 2009] Das Keim- oder Deckepithel und die epitheliale Auskleidung der Eifollikel, welche im Bereich der Ovarialrinde liegen, bestehen aus einem einreihigen kubischen Epithel. Durch die subepithelial gelegene *Tunica albuginea* weist das Ovar eine weißlich spiegelnde Oberfläche vor. [Nauth H. F., 2002]

Der überwiegende Teil des Ovars wird von der Rinde (Zona parenchymatosa) eingenommen, die sich innen an die Bindegewebsschicht Tunica albuginea anschließt. Das Rindenstroma (kortikale Stroma) ist aus zellreichem, spinozellulärem Bindegewebe aufgebaut, in welchem Follikel (beinhalten die Eizellen) und deren Nachfolgestrukturen eingebettet vorliegen (siehe Abbildung). [Rüllmann-Rauch R., 2009] [Bubendorf L.; Feichter G. E.; Obermann E. C.; Dalquen P., 2011] [Nauth H. F., 2002] [Bumm E.; Döderlein A.; Krönig B.; Menge C., 1912] Die Ovarialrinde besteht aus länglichen Stromazellen mit einer glatten Struktur. [Bubendorf L.; Feichter G. E.; Obermann E. C.; Dalquen P., 2011] [Nauth H. F., 2002] Die funktionell wichtigen Strukturen der Follikelreifung umfassen Primordialfollikel, Primärfollikel, Sekundärfollikel, Tertiärfollikel und Graaf-Follikel. [URL-3] Die Follikel sind für die Funktionen des Eierstocks wesentlich und beinhalten die Eizellen. Innerhalb der Ovarien entwickelt sich ein Teil der Primärfollikel zu sprungreifen Eibläschen. [Bubendorf L.; Feichter G. E.; Obermann E. C.; Dalquen P., 2011] [Nauth H. F., 2002] [Bumm E.; Döderlein A.; Krönig B.; Menge C., 1912] Die Eifollikel-Reifung zu sprungreifen Follikeln erfolgt unter dem Einfluss hypophysärer Hormone.

Nach dem Eisprung wandeln sich die Eifollikel in Gelbkörper um. Die äußere Follikelwand besteht aus vom Stroma abstammenden Thekazellen. Die innere Wand des Follikels wird von Granulosazellen gebildet (Bildung von Östrogen). [Nauth H. F., 2002] Bei der Ovulation rupturiert der Graaf-Follikel und entlässt die reife Eizelle in den Eileiter (Tuba uterina). Dabei bleiben Granulosa- und Theka-Zellen im Ovar und wandeln sich zum Gelbkörper (Corpus luteum) um. Durch Ausbleiben der Befruchtung einer Eizelle degeneriert das Corpus luteum zum bindegewebigen Corpus albicans innerhalb des Ovars. [URL-3]

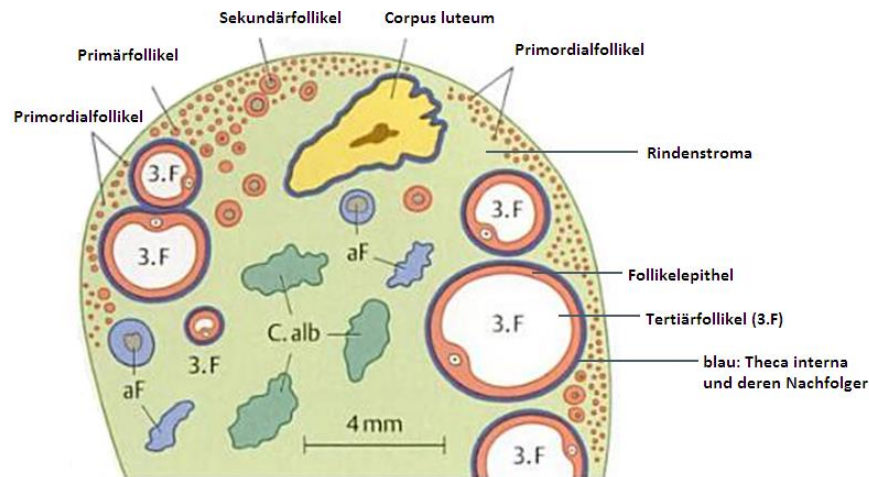


Abbildung 2 menschliches Ovar, Rindenregion (halbschematische Zeichnung nach Originalschnitten)
Tertiärfollikel sind hier noch relativ klein, sprungreife Follikel sind ca. 20 mm groß und wölben die Organoberfläche vor (C. alb. = Corpus albicans, aF = atretischer Follikel) [Rüllmann-Rauch R., 2009]

Das Ovarialmark grenzt zum Zentrum hin an die relativ breite Ovarialrinde. Das Mark besteht aus lockerem Bindegewebe und enthält viele Blutgefäße, Nerven sowie kleine Gruppen von endokrin aktiven interstitiellen Zellen (Hilus-Zellen). Das Mark besteht aus Zellen, die bestimmte Steroidhormone und Androgene produzieren. Im Bereich des Eistockzentrums (sog. Hilus), welches sich in Nachbarschaft zum Mark befindet, verfügt das Organ über die notwendigen Blutgefäße. Das Mark enthält keine Follikel, aber zahlreiche geschlängelte Blutgefäße (zuführende Gefäße) und Nerven. [Rüllmann-Rauch R., 2009] [Nauth H. F., 2002] [Bumm E.; Döderlein A.; Krönig B.; Menge C., 1912] Die Versorgung der Ovarien erfolgt von Gefäßen, die aus der Arteria ovarica und von Ästen der Arteria uterina stammen. [Bumm E.; Döderlein A.; Krönig B.; Menge C., 1912] Das Hilum des Ovars liegt am Margo mesovaricus. [URL-3] Der Eierstock-Hilus wird, aufgrund der Anheftung des Ovars an die beiden Blätter des Ligamentum latum, von serösem Bauchfell überzogen. Nahe dem Hilus schneidet dieser Peritonealüberzug parallel dem Längsdurchmesser die vordere und hintere Ovarfläche. Der größte Teil des Eierstocks weist keinen Überzug auf und ragt frei (ausschließlich von Keimepithel bedeckt) in die Bauchhöhle. [Bumm E.; Döderlein A.; Krönig B.; Menge C., 1912]

Das Oberflächenepithel (Müller-Epithel) leitet sich vom Zölomepithel ab und hat eine wichtige Rolle in der Pathologie des Ovars inne. Aus ihm gehen epitheliale Tumoren (Ovarialkarzinom) hervor. Außerdem können diese Epithelzellen während der Ovulation unter die Oberfläche gelangen und Inklusionszysten ausbilden. Die daraus entstehenden Tumoren entwickeln sich im Inneren des Organs. [Rüllmann-Rauch R., 2009] Das heißt aus dem zellulären Aufbau des Ovars lassen sich die unterschiedlichen Differenzierungen der Ovarialtumoren begründen: epitheliale Tumoren, Keimstrang-Stroma-Tumoren und Keimzelltumoren, sowie Tumoren, welche die Differenzierungen der Embryonalorgane nachahmen. [Bubendorf L.; Feichter G. E.; Obermann E. C.; Dalquen P., 2011] [Nauth H. F., 2002]

1.1.2 Epidemiologie

Eierstockkrebs tritt in Deutschland nach Brust-, Gebärmutterkörper- und Gebärmutterhalskrebs als vierthäufigste bösartige Tumorerkrankung der weiblichen Geschlechtsorgane und als acht-häufigste Krebserkrankung der Frau allgemein auf (altersstandardisierte Erkrankungsrate: 7,4 Frauen pro 100.000 Frauen). [URL-8] Die Mortalitätsrate ist in Deutschland die Viertgrößte – von 100.000 Frauen sterben in Deutschland im Durchschnitt 4,7 an dieser Erkrankung (altersstandardisierte Rate). [URL-8] Auf Eierstockkrebs entfallen 3,5% aller bösartigen Neubildungen der Frauen und 5,6% aller Krebssterbefälle. [URL-10] Der Tumor kommt trotzdem relativ selten vor. [URL-10] Von 68 Frauen erkrankt im Laufe ihres Lebens eine an Eierstockkrebs. [URL-10] Derzeit werden jährlich 7800 Frauen, in Deutschland, neu mit dieser Krebsart diagnostiziert (siehe Tabelle 1). [URL-11] Die wichtigsten epidemiologischen Zahlen sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1 Übersicht über die wichtigsten epidemiologischen Maßzahlen für Deutschland, ICD-10 C56 [URL-9]

| | 2009 | 2010 | Prognose für 2014 |
|---|--------|------------|-------------------|
| | Frauen | Frauen | Frauen |
| Neuerkrankungen | 7.910 | 7.790 | 7.500 |
| rohe Erkrankungsrate ¹ | 19,0 | 18,7 | 18,2 |
| standardisierte Erkrankungsrate ^{1,2} | 12,3 | 12,1 | 11,2 |
| mittleres Erkrankungsalter ³ | 69 | 69 | |
| Sterbefälle | 5.623 | 5.599 | |
| rohe Sterberate ¹ | 13,5 | 13,4 | |
| standardisierte Sterberate ^{1,2} | 7,7 | 7,5 | |
| 5-Jahres-Prävalenz | 22.800 | 22.400 | |
| absolute 5-Jahres-Überlebensrate (2009-2010) ⁴ | | 38 (28-43) | |
| relative 5-Jahres-Überlebensrate (2009-2010) ⁴ | | 42 (31-47) | |

¹ je 100.000 Personen ² altersstandardisiert nach alter Europabevölkerung ³ Median ⁴ in Prozent (niedrigster und höchster Wert der einbezogenen Bundesländer)

Die Prävalenz stellt eine Zustandsbeschreibung einer Krankheit dar und gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass eine zufällig ausgewählte Person zu einem Stichtag an der

betrachteten Krankheit erkrankt ist. [URL-12] Frauen im Alter von unter 40 Jahren, die an Eierstockkrebs erkranken, weisen meist eine genetische Prädisposition auf. Es sind überwiegend Frauen nach den Wechseljahren von dieser Krankheit betroffen, sodass sich der Erkrankungsgipfel zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr befindet. [URL-13] Bis zum 85. Lebensjahr steigt die Rate der Erkrankungsfälle an, wobei das mittlere Erkrankungsalter bei 69 Jahren liegt (siehe Abbildung 3). [URL-11]

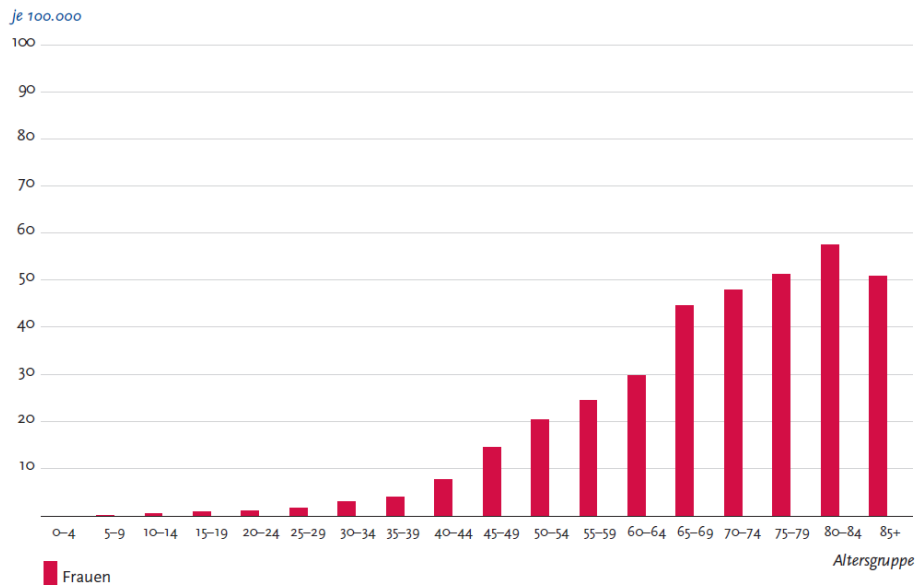


Abbildung 3 Altersspezifische Erkrankungsrate, ICD-10 C56, Deutschland 2009-2010 [URL-9]

Tabelle 2 gibt die Inzidenzraten von Eierstockkrebs über die einzelnen Altersbereiche hinweg an und Tabelle 3 stellt die Mortalitätsraten bezogen auf die jeweiligen Altersbereiche dar. [URL-8]

Tabelle 2 geschätzte Inzidenzrate nach Alter in Dtl. [URL-8]

Raten basierend auf weniger als 10 Fälle = kursiv; all-age-Rate- und altersstandardisierte-Rate pro 100.000; Cumulative risk [0-74] in %

| Total | 0-14 | 15-39 | 40-44 | 45-49 | 50-54 | 55-59 | 60-64 | 65-69 | 70-74 | 75+ | Crude | ASR (W) | Cum. [0-74] |
|-------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|---------|-------------|
| 6673 | 0,2 | 1,7 | 7,1 | 11,2 | 16,6 | 22,6 | 28,6 | 34,4 | 39,4 | 44,7 | 16 | 7,4 | 0,8 |

Tabelle 3 Deutschland – geschätzte Mortalitätsrate nach Alter [URL-8]

all-age-Rate- und altersstandardisierte-Rate pro 100.000; Cumulative risk [0-74] in %

| Total | 0-14 | 15-39 | 40-44 | 45-49 | 50-54 | 55-59 | 60-64 | 65-69 | 70-74 | 75+ | Crude | ASR (W) | Cum. [0-74] |
|-------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|---------|-------------|
| 5379 | - | 0,4 | 2,1 | 4,4 | 7,8 | 12,3 | 18,5 | 26,7 | 36,4 | 51,5 | 12,9 | 4,7 | 0,5 |

ASR (W) gibt die altersstandardisierte Rate gemessen an der Weltbevölkerung an. Cum. [0-74] charakterisiert die kumulative Inzidenzrate, das heißt das Risiko (Nettorisiko) oder die

Wahrscheinlichkeit eines Individuums, bis zu einem bestimmten Lebensalter an Krebs zu erkranken. Der Wert stellt die Rohdaten dar. [URL-14]

Die „Crude“-Daten stellen die Rohdaten dar, wobei die Altersverteilung der betrachteten Population nicht beachtet wird. Damit stellt dieser Wert die „all-age“-Rate dar. [URL15]

Die Inzidenz ist definiert durch die Erkrankungsgeschwindigkeit. [URL-12]

Die Inzidenzrate (Tabelle 2) gibt die Neuerkrankungsziffer an und wird auch als kumulative Inzidenz oder Absolutes Risiko bezeichnet. Sie charakterisiert die Zahl neu auftretender Fälle in einer definierten Bevölkerung pro Zeiteinheit (meist pro Jahr). Aus Vergleichbarkeitsgründen wird die Inzidenzrate zu einer bestimmten Personenzahl der definierten Bezugsbevölkerung (meist pro 1.000 oder pro 100.000) in Zusammenhang gesetzt. [URL-16] Die Kumulative Inzidenz beschreibt die Entstehung einer Krankheit und ist ein alternatives Maß für das Krankheitsrisiko. Damit wird die Wahrscheinlichkeit angegeben, dass eine zufällig ausgewählte Person der Population innerhalb eines zeitlich begrenzten Zeitraums (z. B. ein Jahr) an einer Krankheit neu erkrankt. [URL-17]

Die statistische Malignitätswahrscheinlichkeit erhöht sich mit steigendem Alter der Frau, was bedeutet, dass die Tumoren prämenopausaler Frauen zu 3 % bösartig und in Peri- und Postmenopause zu mehr als 20 % dem malignen Typ entsprechen. [Dudenhausen, 2003]

Bei Erstmanifestationen werden in 70% der Fälle fortgeschrittene Tumorstadien (T-Stadien) diagnostiziert. Die Prognosen sind schlecht und die 5-Jahres-Überlebensrate liegt unter 40% (siehe Abbildung 4).

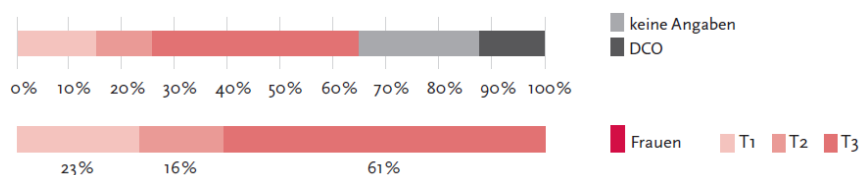


Abbildung 4 Verteilung der T-Stadien bei Erstdiagnose, Dtl. 2009-2010, ICD-10 C56 [URL-9]
(oben: inkl. fehlender Angaben und DCO-Fälle, unten: nur gültige Werte)

Das mittlere rezidivfreie Intervall liegt zwischen 18 und 24 Monaten mit einer 80%-igen Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs innerhalb von 5 Jahren. [Anastasi E, et al., 2010]

Werden die Tumoren in frühen Stadien erkannt, beträgt die 5-Jahre-Überlebensrate mehr als 80%, was den Nutzen einer frühen Diagnose begründet. [URL-17]

Die Erkrankungs- und Sterberaten sowie die absoluten Fallzahlen sinken in Deutschland seit der Jahrtausendwende deutlich (siehe Abbildung 5). [Dr. med. Gültén Oskay, 2010]

Abbildung 4 gibt Erkrankungs- und Sterberaten zwischen 1999 und 2010 an. Die absoluten Zahlen der Neuerkrankungs- und Sterbefälle werden in Abbildung 5 aufgezeigt. [URL-11]



Abbildung 5 Erkrankungs- und Sterberaten (links); Absolute Zahl der Neuerkrankungs- u. Sterbefälle (rechts), ICD-10 C56, Dtl. 1999-2010 [URL-9]

Die Heilungsprognosen sind sehr gut, wenn, in einem frühen Stadium der Erkrankung, der Tumor noch nicht in umliegende Gewebe gestreut hat. [Anastasi E, et al., 2010] Fortgeschrittene Stadien sind nur schwer heilbar. Bei drei von vier Frauen liegt bei Diagnosestellung bereits ein fortgeschrittenes Stadium vor. [URL-11]

Abbildung 4 gibt Erkrankungs- und Sterberaten zwischen 1999 und 2010 an. Die absoluten Zahlen der Neuerkrankungs- und Sterbefälle werden in Abbildung 5 aufgezeigt. [URL-9]

Eine Metaanalyse von Bristow et al. zeigt einen Anstieg in der mittleren Überlebenszeit während der letzten 20 Jahre durch zunehmend radikalere operative Behandlungsmaßnahmen. [Bristow et al., 2002] [URL-8]

1.1.3 Ätiologie

Die Ovarien sind von einer einzelligen Schicht des Bauchfell-Mesothels (Peritoneum) umgeben, welches aus dem Zölom während der menschlichen Entwicklung hervorgegangen ist und die Fähigkeit besitzt, eine metaplastische Transformation in einen malignen Phänotyp mit einem höher-differenzierten Status zu durchlaufen. Eierstockkrebs entsteht aus postovulatorischen Einschlusszysten, die einer längeren Belastung mit Hormonen und Chemokinen ausgesetzt waren. [Auersperg, 2001]

Frauen mit einer größeren Zahl ovulatorischer Zyklen besitzen ein erhöhtes Risiko an Eierstockkrebs zu erkranken („Incessant Ovulation“-Hypothese von Fathalla, 1971). Diese Hypothese besagt, dass bei jeder Ovulation die Zellen des Oberflächen-Epithels eingeschlossen und beschädigt werden und dass Reparatur-Mechanismen in den Zellen das Risiko erhöhen Mutationen und bösartige Tumoren zu entwickeln. Während des Eisprungs wird das Oberflächen-Epithel des Ovars beschädigt und die reparierten Zellen anfällig für Mutationen. [Fathalla, 1971] Die Inklusionszysten entstehen nach erfolgtem Eisprung (Ovulation). Durch den Eisprung entstehen Rupturen (Verletzungen) auf der Ovar-Oberfläche, welche zelluläre Reparaturmechanismen (Zellteilungen) in Gang setzen und durch vermehrte Proliferation der umliegenden Zellen repariert werden. Damit steigt die Gefahr von unkontrollierter Proliferation und in der Folge die Entstehung von DNA-Schäden sowie karzinogenen Mutationen. Die Wahrscheinlichkeit, dass sich auf der Oberfläche des Ovars Neoplasien bilden, nimmt zu. [Mok et al., 2007; Landen et al., 2008; Tortolero-Luna & Mitchell, 1995]

Außerdem stellen die Ausschüttung follikulärer Flüssigkeit, welche reaktive Sauerstoff-Spezies wie freie Radikale enthält, und die Veränderung der Mikro-Umgebung durch Entzündungsvorgänge während der Ovulation Ursachen in der frühen Eierstock-Karzinogenese dar. [Beral, 2007; Risch HA, et al., 1983]

Die Gonatropin-Hypothese theorisiert die Stimulation des Eierstock-Oberflächenepithels durch Follikel-stimulierende Hormone und luteinisierende Hormone. Deren Zelleinwirkung erhöht das Risiko eine EOC-Erkrankung zu entwickeln. Follikel-stimulierende Hormone (FSH), luteinisierende Hormone (LH) und menschliches Chorion-Gonatropin stimulieren die Proliferation des ovariellen Oberflächenepithels und aktivieren den Mitogen-aktivierten Kinase-Signalweg (MAPK), die Hoch-Regulierung des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors 2 (HER2) sowie potentielle Onkogene. Bisher hat keine Studie bewiesen, dass der Kontakt mit Gonatropin die Transformation des ovariellen Oberflächenepithels zu einem malignen Phänotyp induziert. Die Hypothese geht davon aus, dass hohe Konzentrationen an Hormonen wie FSH und LH einen stimulatorischen Effekt auf Wachstum, Zellteilung und Mutationen haben. [Choi, 2002] Die Hypothese wird gestützt durch die Tatsache, dass mit Einsetzen der Menopause die Wahrscheinlichkeit einer ovariellen Krebserkrankung steigt und zum gleichen Zeitpunkt das Gonatropin-Level zunimmt. [Mok et al., 2007]

Hohe Konzentrationen von Androgenen in der Mikro-Umgebung des Tumors verursachen durch ihre hormonelle Stimulation die Tumorentstehung. [SCHILDKRAUT, 1996] Außerdem ist bewiesen, dass diese Hormone das Wachstum von Krebszellen in-vitro fördern und in

Krebszellen die Expression von Androgen-Rezeptoren aufrechterhalten wird. Das deutet darauf hin, dass diese Hormone die Entwicklung von Eierstockkrebs begünstigen. [Wang PH, 2004]

Die ätiologische Rolle von Entzündungsprozessen, die mit jedem Eisprung einhergehen, ist mit der Ausschüttung von Zytokinen, dem Zufluss entzündlicher Zellen sowie der Gewebe-Rekonstruktion verbunden. Beschädigungen am Oberflächen-Epithels der Ovarien induzieren Entzündungen, die

Heilungsprozesse und Mutationen begünstigen. Diese Prozesse (Entzündungen, Zytokin-Ausschüttung, Beschädigungen) setzen das ovarielle Oberflächenepithel Stress aus, sodass dieses genetisch prädisponiert ist für genetische Schäden und maligne Transformationen. [Ness & Cotreau, 1999] Inflammatorische Bedingungen wie Endometriose und entzündliche Beckenerkrankungen sind mit einem erhöhten Risiko verbunden an Eierstockkrebs zu erkranken. [Melin et al., 2006; Parazzini F, et al., 1996]

Das EOK entsteht in 90% der Fälle aus einer einzigen multidysfunktionellen Zelle. Ein Hinweis auf die Klonalität von Eierstockkrebs liegt in der Ähnlichkeit zwischen Primärtumor und metastatischen Läsionen, während der Verlust der Heterozygotität, die X-Chromosom-Inaktivierung und spezifische Genmutationen auftreten. [Duggan & Dubeau, 1998]

Vererbte genetische Funktionsstörungen machen ungefähr 10% bis 15% der Frauen mit Eierstockkrebs aus. Davon weisen etwa 90% Mutationen in den Genen BRCA1 oder BRCA2 auf. [Jazaeri, 2002; Aarnio M, et al., 1999; Christie M, Oehler MK, 2006] Die zugrunde liegenden Mutationen liegen auf den Genen BRCA1 und BRCA2, die über eine hohe Penetranz verfügen und in 90% der erblich bedingten Eierstockkrebsfälle mutiert vorliegen. Bei Trägern von BRCA1-Mutationen beträgt das lebenslange Eierstockkrebs-Risiko ungefähr 40% bis 50% und bei Trägern von BRCA2-Mutationen liegt es bei 20% bis 30%. [Christie M, Oehler MK, 2006; Aarnio M, et al., 1999]

10 % der Fälle mit einer genetischen Prädisposition auf dem BRCA-Gen verfügen über eine Mutation im Mismatch-Reparatursystem. [Fleming et al., 2006; Gadducci et al., 2004; Capen, 2004] Die Kanzerogenese von Tumoren, denen eine BRCA1- oder BRCA2-Mutation zugrunde liegt, entstehen über unterschiedliche Signalwege. [Cass et al., 2003] Die von diesen Genen kodierten Proteine BRCA1 und BRCA2 sind Wärter innerhalb des Genoms und spielen eine Schlüsselrolle bei der Induktion von Apoptose sowie bei der Beobachtung von Zellzyklus-Checkpunkten. Zellen, die über keine funktionellen BRCA-Proteine verfügen, weisen vermehrt Aneuploidien, Centrosomen-Amplifikationen und chromosomale Aberrationen auf, welche die

Zellen anfällig für weitere Mutationen machen. Das erhöhte Risiko für eine Vielzahl weiterer Mutationen entsteht durch Defekte in der Mismatch-Reparatur-Maschinerie und der daraus resultierenden genetischen Instabilität. [Boulton, 2006; Rosen et al., 2003; Venkitaraman, 2002; Yoshida & Miki, 2004]

Mehr als 85% der Ovarialkarzinome sind sporadischer Natur und nicht mit erblichen Faktoren assoziiert. [Christie M, Oehler MK, 2006]

1.1.4 Kanzerogenese

Die Pathogenese des Ovarialkarzinoms wird mithilfe eines dualistischen Modells beschrieben (siehe Abbildung 6). Dieses Modell bestätigt die heterogene Natur des epithelialen Ovarialkarzinoms und platziert die histologischen Haupt-Typen des Ovarialkarzinoms (serös, endometrioid, klar-zellig, muzinös) in zwei Gruppen: Typ I und Typ II, basierend auf deren klinisch-pathologischen und molekular-genetischen Eigenschaften. [Kurman & Shih, 2011; Jones et al., 2010; Wiegand et al., 2010] Das dualistische Modell hebt die Heterogenität des Eierstock-Karzinoms hervor und zeigt auf, dass Screening-Tests nicht effektiv genug sind um die verschiedenen Typen zu detektieren. [Güth et al., 2007] Die beiden Typen entwickeln sich entlang unterschiedlicher molekularer Signalwege und entstehen sekundär außerhalb der Eierstöcke. [Kurman & Shih, 2011]

Eierstockkrebs entwickelt sich auf zwei Wegen: über einen schrittweisen Mutationsprozess (low-grade pathway; Typ I) oder durch große genetische Instabilität, was zu schneller Metastasierung ohne identifizierbare Vorstufen-Läsionen führt (high-grade pathway; Typ II). [Gershenson et al., 2006]

Typ I-Karzinome kommen in 25% aller epithelialen Ovarialkarzinom-Fälle vor. [Kurman et al., 2008] Die zu dieser Gruppe gehörenden Tumoren, sind gut differenzierte seröse, gut differenzierte endometrioide, klar-zellige und muzinöse Karzinome, sowie Brenner-Tumoren. Diese Tumoren entwickeln nur selten eine *TP53*-Genmutation und sind genetisch stabil. Die Karzinome entwickeln sich schrittweise aus einer Vorläufer-Läsion wie zum Beispiel aus Boderline-Tumoren oder einer vorliegenden Endometriose und wachsen daher sehr langsam. Ihr Verhalten ist indolent, sie verfügen über eine gute Prognose und sind meist auf ein einziges Ovar beschränkt (Stadium Ia). [Kurman & Shih, 2011; Jones et al., 2010; Wiegand et al., 2010; Gershenson et al., 2006] Das heißt die Tumoren erlangen eine große Masse und sind dabei trotzdem sehr lange nur auf das Ovar beschränkt, bevor sie in andere Organe streuen. Mithilfe der Abtastung des Bauchs und durch transvaginalen Ultraschall können die Tumoren detektiert werden. Sie stellen 25% der gesamten ovariellen Krebserkrankungen und ungefähr 10% aller

Eierstockkrebs-bedingten Todesfälle dar. [Güth et al., 2007] Die niedriggradig (low-grade) bösartigen Tumoren zeigen ein schlechteres Ansprechen auf Chemotherapie und teilen molekulare Charakteristika mit Neoplasien, die ein weniger bösartiges Potential (low-malignant potential, LMP) haben. [Gershenson et al., 2006]

Tumoren vom Typ II umfassen schlecht-differenzierte seröse, endometrioid, Karzino-Sarkome und undifferenzierte Karzinome. Sie verhalten sich sehr aggressiv, wachsen sehr schnell und treten in fortgeschrittenen Stadien auf (Stadien II-IV). [Kurman & Shih, 2011; Ahmed et al., 2010; Senturk et al., 2010] Sie sind relativ chemosensitiv und weisen keine bestimmten Vorläufer-Läsionen auf. [Gershenson et al., 2006]

Außerdem weisen die high-grade Karzinome eine hohe *TP53*-Mutationsfrequenz auf – in 50% bis 80% der hochgradig-invasiven Karzinome liegt das Tumorsuppressorgen *TP53* mutiert vor. Die molekularen Veränderungen in Typ-II-Tumoren stören die Expression der *BRCA*-Gene durch *BRCA*-Inaktivierung über Genmutation oder durch Ausschalten von downstream-gelegenen Genen über Promotor-Methylierungen. Außerdem weisen die Tumoren eine hohe genetische Instabilität auf. [Kurman & Shih, 2011; Ahmed et al., 2010; Senturk et al., 2010; Kupryjanczyk et al., 1993] Ovarialkarzinome vom Typ II repräsentieren 75% aller ovariellen Karzinome und sind für 90% aller Eierstockkrebs-bedingten Todesfälle verantwortlich. [Güth et al., 2007] Sie verfügen über einen hohen Grad an Chromosomen-Instabilität und werden durch p53- und *BRCA1/2* Mutationen charakterisiert. [Kurman et al., 2008]

Schlecht-differenzierte endometrioid Karzinome zeigen neben Mutation im *TP53*-Gen molekulare Veränderungen, die in gut-differenzierten endometrioiden Karzinomen vorhanden sind. Daher geht man davon aus, dass sich einige gut-differenzierte endometrioid Karzinome in schlecht-differenzierte Karzinome entwickeln können. Derselbe Zusammenhang besteht bei serösen Karzinomen – die gut- und schlecht-differenzierten Tumoren entstehen unabhängig voneinander, aber es finden Entwicklungen von gut- zu schlecht-differenzierten Karzinomen statt. Die ähnlich hohe Mutationsfrequenz des Gens *TP53* in high-grade endometrioiden und low-grade serösen Karzinomen schlussfolgert, dass sich beide durch die *TP53*-Mutation auf eine ähnliche Weise entwickeln und die meisten der high-grade endometrioiden Karzinome in enger Beziehung zu Varianten des high-grade serösen Karzinoms stehen. [Jiang X, et al., 1998] Beiden Signalwegen (Typ I und Typ II) ist gemeinsam, dass die malignen Zellen die immunologische Überwachung umgehen, in Stroma-Gewebe einwandern, sich innerhalb des

Peritoneums festsetzen und kontinuierliches Wachstum sowie Blutgefäß-Bildung (Angiogenese) aufweisen (siehe Abbildung 6). [Landen et al., 2008]

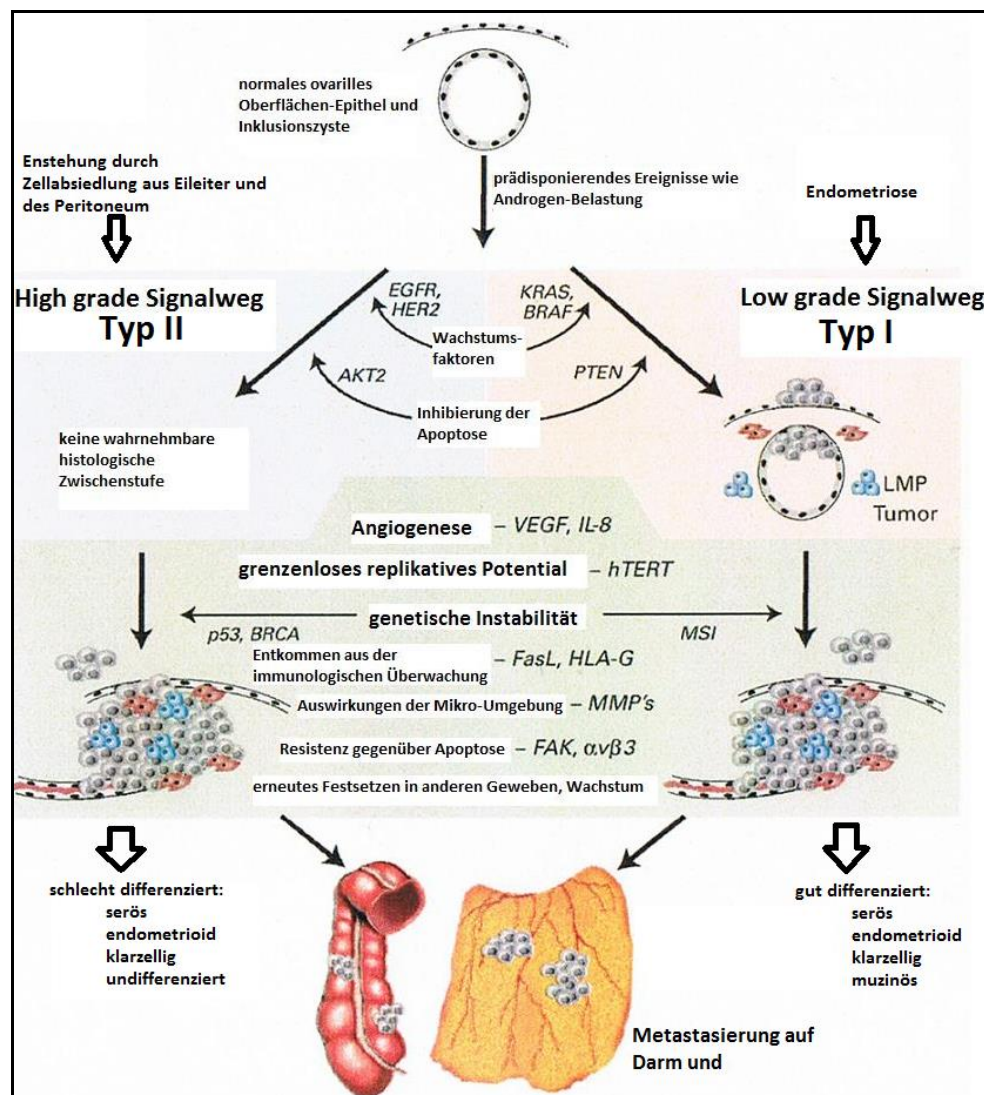


Abbildung 6 Modell der ovariellen Karzinogenese

rot: Faktor der die Entstehung einer Mikro-Umgebung begünstigt → Produktion von Matrix-Metalloproteinasen durch Fibroblasten; blau: Infiltration inflammatorischer Zellen [Landen et al., 2008; Kurman et al., 2008]

Bösartige Tumoren entstehen wenn eine Tumor-Zelle protektive Mechanismen überwindet und sich in einen klinisch evidenten Tumor entwickelt. Diese Mechanismen umfassen gestörte Proliferationsprozesse, Inhibierung der Apoptose, Angiogenese, Invasion in das Stroma, Separierung und Überleben entfernt vom Primärtumor sowie Implantation und Wachstum in neue Gewebe. Die Tumorzellen entwickeln verschiedene Strategien um zu überleben. [Hanahan & Weinberg, 2000]

Tumorzellen besitzen eine Eigen-Autarkie bezüglich von Wachstumssignalen. Sie weisen Resistenz gegenüber Signalen auf, die gegen Wachstum gerichtet sind. In Zellen, die sich in einem frühen Transformationsstadium befinden, müssen Signale, die das Zellwachstum vermindern, überwunden werden. [Landen et al., 2008] Die Zellteilung wird durch die Cyclin D und E regulierte Ausschüttung von E2F durch Rb kontrolliert. Cyclin E wird in 70% aller malignen Tumoren exprimiert und ist mit einer schlechten Überlebensrate assoziiert. Die Cyclin-abhängige Kinase 1 (CDK1) bildet mit Cyclin B einen Komplex um den Eintritt der Zellen in die M-Phase des Zell-Zyklus zu regulieren und wird in 80% der Eierstockkrebs-Fälle mit einem hohen Expressionsniveau gebildet, obwohl es in normalem Oberflächen-Epithel nicht vorkommt. Es liegt eine Vielzahl von Aberrationen in der Genetik der Zell-Zyklus-Regulierung vor, sodass ein Wachstumsvorteil für Eierstock-Krebszellen entsteht. [Barrette et al., 1997; Sui et al., 2001; Landen et al., 2008] Neben einer vermehrten Zellteilungs-Rate ist der Mechanismus der Apoptose herunter gefahren, sodass die Zellen ein verlängertes Überleben aufweisen und der Zelltod unterdrückt wird. Ein Protein, welches in diesem Zusammenhang mutiert vorliegt, ist das p53-Protein. [Landen et al., 2008] Das unbegrenzte replikative Potential der Krebszellen zeigt sich durch die Aufrechterhaltung der telomeren Enden mithilfe des Enzyms Telomerase (Reverse Transkriptase), das aus einer RNA-Komponente (hTR) und einer katalytischen Untereinheit (hTERT) aufgebaut ist. Normale Zellen durchlaufen eine bestimmte Anzahl an Teilungen bevor sie in die Seneszenz übergehen und sterben (Apoptose). Die Uhr für diesen Signalweg liegt in den telomeren Enden am Ende der Chromosomen, die mit steigender Zahl an Teilungen immer kürzer werden. Ohne den Schutz durch Telomere sind die Chromosomen einer Vielzahl von Defekten ausgesetzt, die das Protein p53 und andere überwachende Proteine aktivieren um die Zellen in eine Apoptose zu treiben. In den meisten Krebszellen steigt die Expression der katalytischen Untereinheit (hTERT) mit zunehmender Tumorigenität (bei Eierstockkrebs 81% bis 86%) und in der Folge die Telomerase-Aktivität. [Landen & Klingelhutz, 2004; Poremba et al., 2002; Yang et al., 2007; Zhou & Liu, 2003]

Die frühen Ereignisse in der Tumor-Mikroumgebung sind Angiogenese (Bildung von Blutgefäßen) zur vaskulären Versorgung des Tumors, Einwanderung in umgebendes Stroma-Gewebe, Penetration lymphatischer und vaskulärer Räume und Metastasierung, die für ein Zusammenspiel zwischen Tumorzellen und normalem umgebendem Gewebe sorgen. Ein Tumor besteht neben den Tumorzellen ebenfalls aus Matrix-Komponenten, Stromazellen und entzündlichen Zellen. [Wang E, Ngalame Y, Panelli MC, et al., 2005]

1.1.5 Klassifikation der Ovarialtumoren

Ovarialtumore werden nach ihrem Ursprungsgewebe (Histologie) in epitheliale Ovarialkarzinome, Keimstrang-Stroma-Tumore, Keimzelltumore, Bindegewebstumore (Sarkome), Ovarialmetastasen (z. B. vom Brust- oder Magenkrebs), extraovarielle (peritoneale) Karzinome und Borderline-Tumoren (LMP-Tumore = low malignant potential) eingeteilt (siehe Abbildung 7).

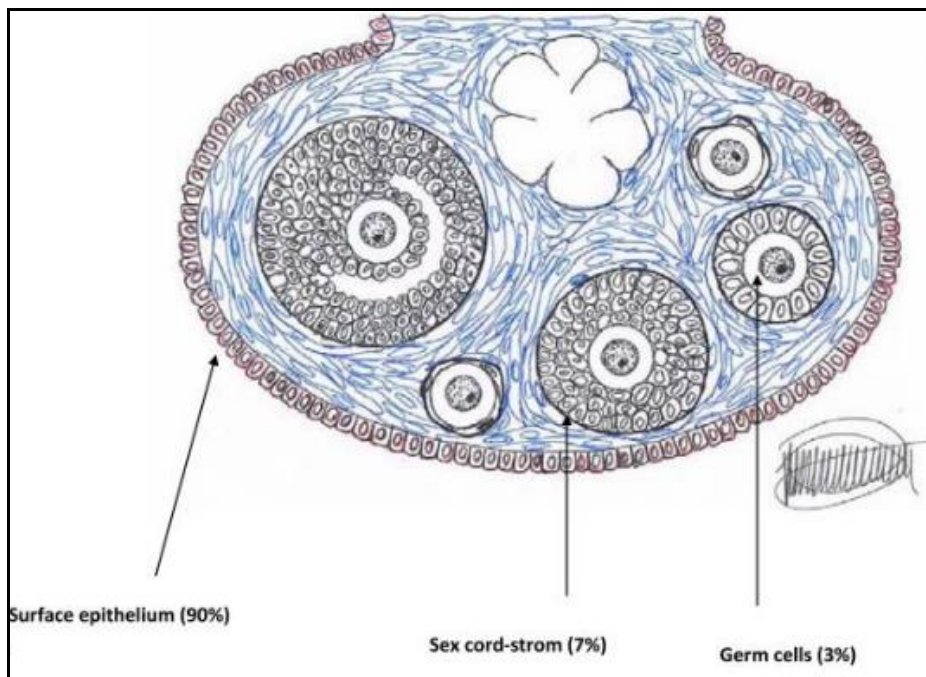


Abbildung 7 verschiedene Ovarialtumore stammen von unterschiedlichen Zell-Subtypen
[Romero I and Bast RC, 2012]

Von allen Ovarialtumoren umfassen 60% bis 65 % epitheliale Ovarialtumoren (Ovarialkarzinome). In dieser Gruppe gibt es verschiedene histologische Subtypen, wobei Mischformen bzw. Übergänge unter den einzelnen Tumorentitäten vorliegen. Die histologischen Haupttypen des Ovarialkarzinoms umfassen serös (entspricht dem Tubenepithel), muzinös (entspricht der Zervixschleimhaut bzw. dem intestinalen Drüsenepithel), endometrioid (ähnelt dem Endometrium) und Brenner-Tumoren (ähnelt dem Übergangsepithel des Wolff'schen Ganges).

Ungefähr 20% bis 25 % der Ovarialtumoren stellen Keimzelltumoren dar, die sich von embryonalen Stamm(keim)zellen ableiten. Die Keimstrang-/Keimdrüsen-Stromatumoren haben einen Anteil von 3% am Auftreten ovarieller Tumoren und entwickeln sich aus dem sexuell differenzierten Gonadenmesenchym. Zu diesem Gewebe gehören Granulosa, Theka-, Sertoli- und Leydigzellen, welche hormonaktiv sind.

Epitheliale Tumoren werden nach ihren histologischen Kennzeichen (serös, muzinös, endometrioid, Brenner) und ihrem klinischen Verhalten (malign, benign) unterschieden. Außerdem existieren Tumoren niedrig maligner Potenz (LMP – low malignant potential, Borderline-Tumoren), die sich von benignen Veränderungen durch gesteigerte Proliferation und zelluläre Atypien unterscheiden, aber nicht in Gewebe infiltrieren oder dieses zerstören.

Etwa 20 % aller Neoplasien der Ovarien sind serösen Ursprungs. Dabei handelt es sich um wenig gekammerte Tumoren, die von einem einreihigen, zilientragenden Epithel ausgekleidet sind. Seröse Karzinome sind mit einer meist klaren, manchmal trüb-bräunlichen serösen Flüssigkeit gefüllt. Die einfache seröse Form hat eine glatte innere und äußere Oberfläche. Die papilläre Form ist oberflächlich glatt und weist an der Zysteninnenfläche zotten- bis warzenartige (selten blumenkohlartige) papilläre Wucherungen auf.

Muzinöse Ovarialtumoren kommen mit einem Anteil von 20% bis 25 % aller Ovarialtumore vor. Sie treten multilokulär auf und sind mit einem hohen Zylinderepithel ausgekleidet. Die Tumoren sind mit einer fadenziehenden, klaren oder glasigen und manchmal gallertigen Flüssigkeit gefüllt. Der einfache muzinöse Typ weist eine glatte innere und äußere Oberfläche auf.

Brenner-Tumoren kommen zu 1% bis 2 % aller Ovarialgeschwülste vor und sind in 99 % aller Fälle gutartig. Sie haben eine glatte, weißlich-gelbe Oberfläche und sind oft verkalkt. Mikroskopisch werden diese Tumoren durch ein faserreiches Stroma charakterisiert, in welches kleinste rundliche, von Schleim-bildenden Zellen umgebene Zystchen eingebettet sind. 20 % dieser Tumoren sind hormonaktiv.

Keimzelltumoren entwickeln sich aus pluripotenten embryonalen Stammzellen und gehen pathogenetisch auf eine Eizelle nach der ersten Reifeteilung zurück. Die Tumoren haben ein rundliches bis ovaläres Auftreten und ihre Oberfläche ist glatt aber manchmal porzellanartig. Die Anlage zur Ausbildung dieser Art Ovarialtumor ist angeboren und daher treten diese Tumoren im Gegensatz zu den Ovarialtumoren bevorzugt bei jüngeren Frauen auf (Altersgipfel: drittes Lebensjahrzehnt). Der Inhalt der einkammerigen Zyste besteht zum überwiegenden Teil aus gelblich-öligem Talg und Haaren. Diese als Dermoidzysten bezeichneten Wucherungen wachsen vornehmlich aufgrund von Talgsekretion anstatt durch Zellvermehrung.

Bindegewebstumoren machen 5 % der Ovarialtumoren aus und entwickeln sich aus bindegeweblichen Strukturen des Ovars. Der häufigste Vertreter ist das Fibrom, das eine solide, pseudozystische oder myxomatöse Form hat. Die Oberfläche ist glatt, gelegentlich grob

vorgebuckelt und die Schnittflächen sind weißlich mit faseriger Struktur. Die Histologie stellt verflochtene Bündel spindelförmiger Fibroblasten mit zellarmen, ödematösen Arealen dar. Ovarialfibrome sind gutartig. Keimstrang- und Keimdrüsenstromatumoren (4 % der Ovarialtumoren) entstehen aus embryonalen Keimsträngen. Ihre Bezeichnung resultiert aus dem betroffenen Gonaden-Gewebe und unterschiedlichen Anteil involvierten Bindegewebes. Die Keimstrangstromatumoren sind semimaligne Geschwulste. [Dudenhausen, 2003]

1.1.6 Histologische Klassifikation des epithelialen Ovarialkarzinoms

Das Paradigma der ovariellen Karzinogenese sagt aus, dass sich der epitheliale Eierstockkrebs aus verschiedenen histologischen Typen zusammensetzt, deren Ursprünge außerhalb der Ovarien liegen und mit dem betroffenen Organ nur zweitrangig in Verbindung stehen (siehe Abbildung 8). [Scully, Sobin & Serov, 1999]

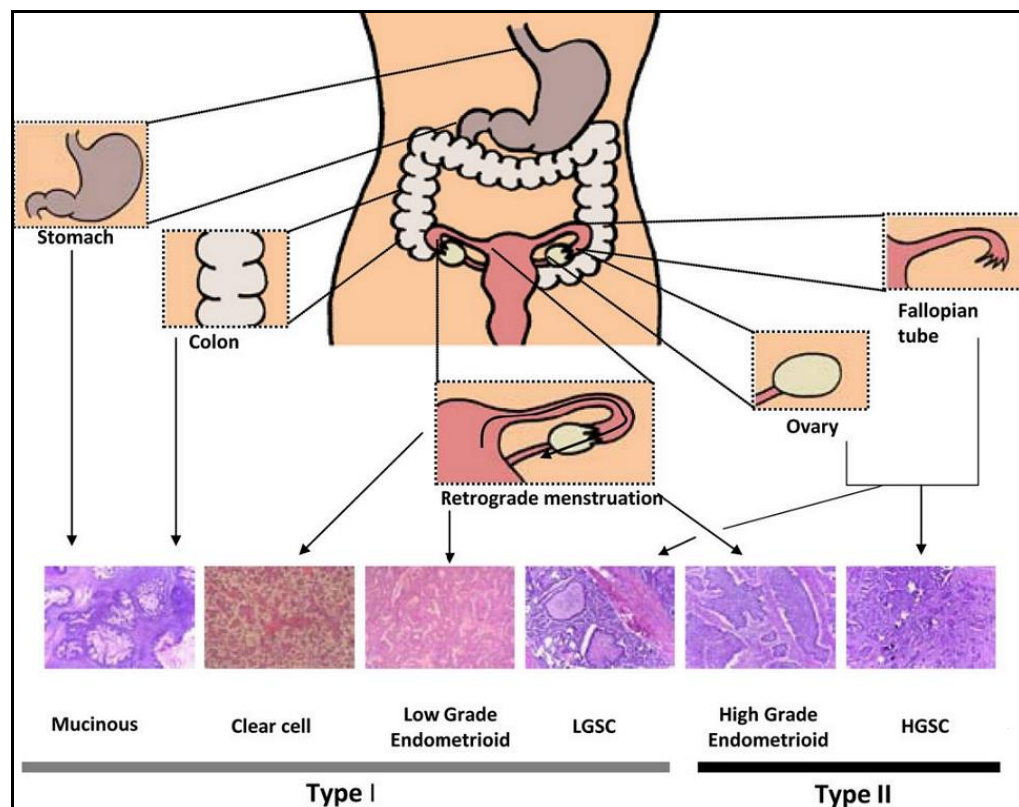


Abbildung 8 Ursprung und histologische Subtypen assoziiert mit der molekularen Klassifizierung nach Typ I und II [Romero I and Bast RC, 2012]

In der Gruppe der epithelialen Ovarialkarzinome besteht eine signifikante Heterogenität. [Bonome et al., 2005]

Karzinome des ovariellen Oberflächenepithels umfassen 90% der bösartigen Tumoren des Ovars. Diese werden in vier histologische Subtypen klassifiziert – serös, endometrioid, klar-

zellig und muzinös, denen verschiedene Charakteristika bezüglich genetischer Anomalien und spezieller Signalwege zugrunde liegen. [Soslow, 2008]

Es besteht die Annahme, dass ovarielle epitheliale Karzinome nicht aus dem Zölom entstehen, welche die Ovarien umschließen, sondern aus Geweben entstehen, die embryologisch vom Müller'schen Gang abstammen. [Dubeau, 2008] Die epithelialen Neoplasien ähneln epithelialen Zellen von Geweben des weiblichen Reproduktionssystems außerhalb der Ovarien, sodass die ovariellen epithelialen Neoplasien außerhalb der Eierstöcke ihren Ursprung haben.

Normale ovarielle Zysten haben einen Durchmesser von weniger als 1 cm und werden von Zellen umschlossen, deren Ursprung im Zölom-Epithel der Ovar-Oberfläche liegt. Sie entstehen durch kortikale Einstülpungen und werden innerhalb des Parenchyms der Eierstöcke eingeschlossen. Ovarialkarzinome entstehen aus Verkapselungen epithelialer Zysten, die von Zellen umgeben sind, deren Ursprung im Eileiter, der Gebärmutter oder dem Endozervix liegen. Die Zysten werden als metaplastisch bezeichnet, da sie kortikale Einschlusszysten bilden, deren Differenzierung durch metaplastische Veränderungen programmiert wurde.

Die drei am weitesten verbreiteten Subtypen des Ovarialkarzinoms sind der seröse, endometrioid und muzinöse Typ, die sich jeweils morphologisch identisch zu Karzinomen des Eileiters, der Gebärmutter (Endometrium) und des Endozervix verhalten. Diese Organe teilen einen gemeinsamen embryologischen Ursprung, der keine Beziehung zu den Ovarien aufweist und als Müller'scher Gang bezeichnet wird. Dahingegen weisen die Eierstöcke keine embryologische Beziehung zu diesem Trakt auf. Zwischen dem ovariellen Epithel und dem der äußeren Hülle des Eileiters, der Gebärmutter und des Endozervix besteht keine Ähnlichkeit, sodass Ovarialkarzinome aus zystischen Strukturen entstehen, die in gesunden Ovarien nicht vorkommen. Die verschiedenen Tumor-Unterarten serös, endometrioid und muzinös stammen vom Müller'schen Oberflächen-Epithel ab im Gegensatz zum Zölom. [Dubeau, 1999]

Seröse Karzinome zeigen solide und zu einem großen Anteil zystische Komponenten. Wobei gutartige seröse Karzinome ausschließlich zystisch auftreten. [Dubeau, 1999] Frauen mit einer familiären Prädisposition bezüglich einer Keimbahn-Mutation in den Genen BRCA1 und BRCA2 weisen nach prophylaktischer Salpingo-Oophorektomie ein erhöhtes Risiko seröse extra-ovarielle Karzinome zu entwickeln. [Finch et al., 2006; Levine et al., 2003; Olivier et al., 2004]

Das Eileiter-Epithel ist in der Lage Zellen auf die Eierstock-Oberfläche zu implantieren und gilt als Ursprung für seröse gut- bzw. schlecht-differenzierte Karzinome. [Kurman & Shih, 2011] Seröse Karzinome entstehen aus kortikalen Einschluss-Zysten des ovariellen Oberflächen-Epithels. [Piek et al., 2001] Die Zysten entstehen aus Einstülpungen der epithelialen Ovar-

Oberfläche, sodass die Hypothese besteht, dass während der Ovulation, wenn der Fimbrientrichter des Eileiters in Kontakt mit dem Ovar tritt, Epithel-Zellen des Eileiters auf der beschädigten Ovar-Oberfläche implantieren und eine Einschluss-Zyste bilden (siehe Abbildung 9). [Kurman & Shih, 2010]

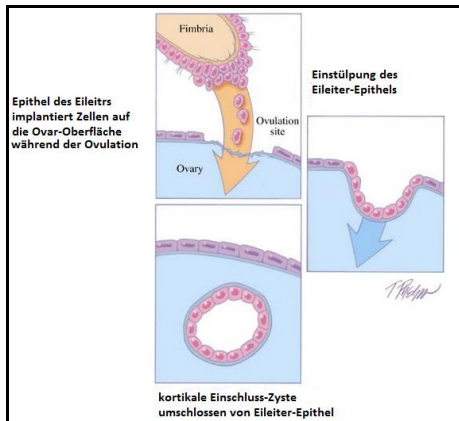


Abbildung 9 Entwicklung einer kortikalen Einschluss-Zyste aus Eileiter-Epithel [Kurman & Shih, 2010]

Das Fimbrien-Ende des Eileiters hat seinen Ursprung im Müller'schen Gang. Sie reiben während des Eisprungs an der Oberfläche der Eierstöcke und haften ihnen durch inflammatorische Prozesse an, wodurch kanzerogene Zellen übertragen werden können (siehe Abbildung 10). Die Fimbrien können, nachdem prophylaktische Operationen aufgrund genetischer Veranlagungen zu Eierstockkrebs vorgenommen wurden, bei denen die Eileiter entfernt werden, weiterhin präneoplastischen Veränderungen wie Dysplasien unterliegen und neue Krebsgeschwülste verursachen. [Colgan et al., 2001; Leeper et al., 2002; Piek et al., 2001]

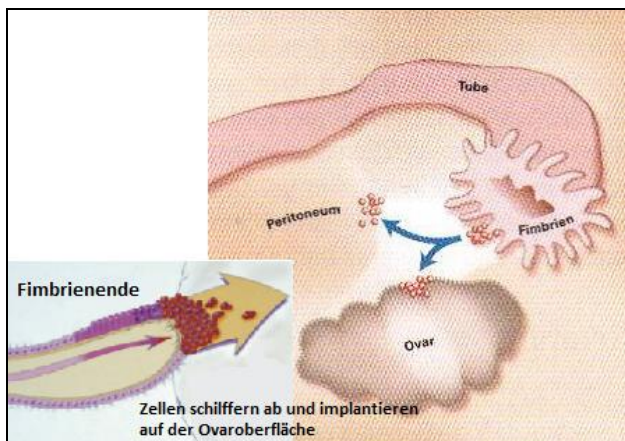


Abbildung 10 Hypothetischer Entstehungsmechanismus für high-grade seröse pelvine Karzinome Ausbreitung vom Fimbriende auf die Ovaroberfläche [URL-18] [URL-19]

Die gutartige Erkrankung Endometriose entsteht aus einer retrograden Menstruation und gilt als Vorläufer der endometrioiden und klar-zelligen Karzinome. [Kurman & Shih, 2011]

Der muzinöse Subtyp habt sowohl in benigner als auch in maligner Form ein zystisches Auftreten. [Dubeau, 1999] Muzinöse Tumoren kommen eher selten vor – der Anteil liegt bei etwa 3% des epithelialen Ovarialkarzinoms. [Gemignani et al., 2003]

Der Ursprung muzinöser und transitional-zelliger (Brenner-) Tumoren liegt in der tubo-peritonealen Verbindung. [Kurman & Shih, 2011] Weiterhin besteht die Annahme, dass der muzinöse Subtyp und die Brenner-Tumoren aus Zellen des gastrointestinalen Trakt, genauer der gastrointestinalen Mukosa, die nicht vom Müller'schen Gang abstammt, entstehen. Daher verfügen die muzinösen Karzinome und die Brenner-Tumoren anders als die serösen, endometrioiden und klar-zelligen Tumoren nicht über einen Müller'schen Phänotyp. [Seidman & Khedmati, 2008]

1.2 Das TP53-Gen

Das Gen *TP53* ist das am meisten mutierte Tumorsuppressorgen humaner Krebsarten. [Willner et al., 2007] Die Integrität eines Organismus ist von großer Bedeutung und muss bei der Weitergabe genetischer Information von der Mutterzelle auf die Tochterzelle gewährleistet werden. Die Zellteilung verfügt in ihrem Verlauf über unterschiedliche Kontrollpunkte, welche diese Integrität (Unversehrtheit) der DNA prüft. Dabei werden vorangegangene Schritte auf deren regelkonformen Ablauf hin kontrolliert sowie komplexe Regulationsmechanismen durchlaufen, damit sich eine Zelle nur unter der Bedingung teilt, dass die DNA korrekt repliziert wurde und intakt ist. [Sewing M]

Innerhalb dieses Kontrollsystems besitzen die Tumorsuppressorgene eine wichtige Aufgabe, wobei das Gen *TP53* das erste beschriebene Gen dieser Gruppe darstellt. [Sewing M, 2011]

Das Tumorsuppressorgen *TP53* ist auf dem kurzen Arm von Chromosom lokalisiert (17p13.1). [Benchimol et al., 1985; Isobe et al., 1986]. Es kodiert für das gleichnamige Protein p53, welches aus 393 Aminosäuren aufgebaut ist und ein Molekulargewicht von 53 kDa aufweist. Die Wissenschaftler David Lane und Arnold Levine fanden und erforschten im Jahr 1979 unabhängig voneinander das im Zellkern vorkommende Phosphoprotein als Bindungsprotein von SV40-Tumorviren. [LANE & Crawford, 1979; Linzer DI, Levine AJ, 1979]

David Lane gab dem Protein 1992 den Titel „Wächter des Genoms“, aufgrund seiner protektiven und antikarzinogenen Eigenschaften. [Lane, 1992]

Funktion des p53-Proteins

p53 weist über unterschiedliche Wege einen hemmenden Einfluss auf die Tumorgenese auf. Als Transkriptionsfaktor reguliert es in zellulären Situationen von Stress und nach Zellschädigungen die Expression von Genen, welche in den Zellzyklus-Arrest, die DNA-Reparatur und die Zellalterung involviert sind. Daneben interagiert p53 mit einer Vielzahl von zellulären Proteinen, die in Korrelation zur Wachstumshemmung und zur Kontrolle des programmierten Zelltods (Apoptose) stehen. [Whibley et al., 2009] Die Wirkungen einer p53-Aktivierung variieren in Abhängigkeit vom vorliegenden Zelltyp sowie auf zellulärer Ebene durch Phosphorylierung und Acetylierung u. a.. [Vousden & Lane, 2007] Außerdem beeinflussen verschiedene Isoformen des Proteins dessen biochemisches Wirkungsspektrum. Das p53-Protein liegt in einzelnen Zellen in unterschiedlichen Expressionsmustern vor. [Bourdon et al., 2005; Müller M, Schleithoff ES, Stremmel W, Melino G, 2006]

Auswirkungen einer p53-Aktivierung

Ein Effekt der p53-Aktivierung ist ein Abstoppen des Zellzyklus (Zellzyklus-Arrest), der eine ausgedehnte DNA-Reparatur ermöglicht. Durch eine funktionelle Inaktivierung von p53 kommt es zum Verlust des Checkpunkts zwischen zwei Phasen innerhalb des Zellzyklus und in der Folge zu einem Ausfall des Zellzyklus-Arrests sowie einer Akkumulation von DNA-Schäden. Die maligne Entartung einer Zelle wird durch diese Vorgänge begünstigt. [Vogelstein et al., 2000]

Ist eine DNA-Reparatur nicht möglich oder verläuft sie fehlerhaft, wird nach der Aktivierung des Tumorsuppressor-Proteins p53 die Apoptose ausgelöst, damit die Weitergabe geschädigten Erbguts verhindert wird. [Bates, S. & Vousden, K. H., 1996; Vogelstein et al., 2000] Über Mediatoren wird dieser Ablauf vermittelt – es werden Genregionen durch p53 aktiviert, welche für Proteine kodieren, die eine Apoptose einleiten. Ein weiterer Mechanismus über den p53 in der Lage ist den Zelltod einzuleiten, ist eine direkte Stimulation der Mitochondrien und eine konsekutive Absonderung zelltoxischer Substanzen. [Vogelstein et al., 2000]

Ein weiterer Effekt der p53-Aktivierung ist eine Inhibierung der Vaskularisierung, das heißt der Neubildung von Blutgefäßen. Unter normalen Bedingungen wird dieser Prozess gehemmt, aber Zellen in denen p53 inaktiviert vorliegt, geht diese Fähigkeit verloren. Dabei unterliegt die Vaskularisierung keiner Kontrolle mehr und ein wachstumslimitierender Faktor ist ausgeschaltet. [Vogelstein et al., 2000]

Mutationen im TP53-Gen

Das Protein p53 ist in mutierter Form bei 70% der schlecht-differenzierten serösen Ovarialkarzinome vorhanden. Außerdem liegt das Gen in schlecht-differenzierten endometrioiden und bei 8% der muzinösen Karzinome mutiert vor. [Willner et al., 2007]

Das vom TP53-Gen kodierte Protein ist p53, welches normalerweise den Zell-Zyklus-Arrest fördert und Reparatur-Mechanismen oder den apoptotischen Signalweg initiiert. Man geht davon aus, dass bei fehlender Mutation des TP53-Gens die Funktion des p53-Proteins auf eine andere Weise verändert vorliegt. Mögliche Veränderungen des p53 sind Veränderungen in der Bildung p53-bindender Proteine oder eine vermehrte Zerstörung des Proteins selbst durch Ubiquitinierung. Die meisten p53-Mutationen basieren auf einer Missense-Mutation, wobei aber spezielle Mutationen wie Null-Mutationen eine Schlüsselrolle bei der Entstehung eines metastatischen Phänotyps spielen. Die Mutation wird im ersten Stadium der Erkrankung noch nicht erkannt. Man geht davon aus, dass die Mutation trotzdem zu einem frühen Ereignis der Eierstockkrebs-Pathogenese gehört. [Michalovitz et al., 1991; Skilling et al., 1996; Marks JR, Davidoff AM, Kerns BJ, Humphrey PA, Pence JC, Dodge RK, Clarke-Pearson DL, Iglehart JD, Bast RC Jr, Berchuck A, 1991; Landen et al., 2008]

p53 und genetische Stabilität

Um die Entstehung und die Progression karzinomatöser Erkrankungen zu verstehen, ist eine zunehmende genetische Instabilität von zentraler Bedeutung. [Loeb LA, 1991] Die genetische Instabilität umfasst eine große Zahl genomischer Veränderungen, wie den Verlust oder die Vermehrung von Chromosomen sowie genetische Veränderungen auf der Ebene einzelner Gene. Die Gene unterliegen verschiedenen Arten von Mutationen – Rearrangements, Translokationen, Amplifikationen, Deletionen und Punktmutationen. [Nowell, 1976; Pienta KJ et al., 1989; Solomon E et al., 1991; Temin HM, 1988] Aufgrund seiner regulatorischen Funktion spielt p53 eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der genomischen Stabilität. Durch Defekte im TP53-Gen wird die konsekutive Anhäufung von DNA-Schäden begünstigt und die Tumorentstehung auf indirektem Weg gefördert. [Vogelstein et al., 2000] Ein Gendefekt innerhalb des Zellzyklus-Kontrollsystems wird bei jeder Zellteilung wirksam und dadurch werden genetische Veränderungen zusätzlich zu dem bestehenden p53-Defekt in die folgende Zellgeneration übertragen. In der Folge wird die genetische Information zunehmend instabiler. [Xu Y, 2008] Weiterhin wird die durch p53-Mutation vermittelte Genom-Instabilität durch die Induktion von Genen garantiert, die das Nukleotid-Exzisions-Reparatursystem, die

chromosomale Rekombination und die Chromosomentrennung in der Mitose regulieren. [Vogelstein et al., 2000]

mutiertes p53

P53-Mutationen sind die in Tumoren am häufigsten beschriebenen tumorgenetischen Veränderungen, wobei die Veränderungen der p53-Aktivität auf der Grundlage von Mutationen des Gens selbst oder durch Veränderungen der mit p53 in Zusammenhang stehenden Signalwege bedingt. [Bourdon JC, 2007; Toledo F, Wahl GM; Vousden & Lane, 2007] Normales funktionstüchtiges p53 hat eine maximale 20-minütige Halbwertszeit, die relativ kurz ist. Seine Konzentration wird durch die MDM2 vermittelte Proteolyse innerhalb einer normalen Zelle auf einem konstant niedrigen Niveau gehalten. [Levine AJ, 1989] Im Gegensatz zu den meisten anderen Tumorsuppressor-Genen, bei denen Mutationen zur Inaktivierung der Proteinsynthese führen, liegt das Genprodukt des mutierten *TP53*-Gens in erhöhter Konzentration innerhalb des Tumors auf. [Iggo R, Gatter K, Bartek J, Lane D, Harris AL, 1990] Die Ursache für diesen Zusammenhang liegt darin, dass in der Mehrzahl der Fälle Punktmutationen innerhalb des p53-Genlocus auftreten und eine meist funktionell bedeutsame Region betreffen. [Hollstein M et al., 1991; Lane, 1992; Levine AJ et al., 1991; Soussi T et al., 2006] In ungefähr 80% der Fälle liegt der auftretenden Mutation ein Austausch einer Aminosäure (Missense-Mutation) zu Grunde. [Soussi T et al., 2006] In der Folge werden stabilere Genprodukte mit vollständig oder partiell veränderter Proteinstruktur kodiert und diese gehen mit einer verlängerten Halbwertszeit einher. [Iggo R et al., 1990; Reich NC et al., 1983; Soussi T et al., 2001] Das Protein akkumuliert im Zellkern und immunhistochemisch nachweisbar. [Oren M et al., 1981; Wu GS, El-Diery WS, 1996]

1.2.1 p53 und Ovarialkarzinome

Alterationen im p53-Tumorsuppressorgen gehören zu den häufigsten genetischen Veränderungen epithelialer Ovarialtumoren. [Kohler MF et al., 1993; Frank TS et al., 1994] Patientinnen mit p53-Mutation weisen eine schlechtere Prognose auf. [de Graeff P et al., 2009] Bezüglich des Tumorphänotyps sind gesteigerte Anreicherungen des nukleären Protein p53 in serösen Subtypen häufiger zu finden als in allen anderen histologischen Gruppen des Ovarialkarzinoms. P53 steht mit fortgeschrittenen und entdifferenzierten Tumoren in

Verbindung. [Kmet LM et al., 2003] P53-Mutationen finden sich in etwa 45% der epithelialen Ovarialtumoren, in 5% der Borderline-Tumoren und in 1% der benignen Ovarialtumoren.

Der Großteil der Mutationen im Protein p53 betreffen die Exons 5-8 und in nur 7% sind Veränderungen außerhalb dieses Bereichs gefunden wurden. Zu etwa 86% sind die Mutationen durch den Austausch einer Aminosäure bedingt. Am häufigsten treten Missense-Mutationen, gefolgt von Nonsense-Mutationen und Silent-Mutationen auf. Bei einigen genetischen Veränderungen liegt der Austausch einer Aminosäure im Bereich eines Introns. Außerdem finden sich Deletionen und Insertionen. Die verschiedenen Mutationstypen zeigen keine Assoziation zu den einzelnen histologischen Tumorsubtypen. [Kmet LM et al., 2003]

1.2.2 p53-Autoantikörper (p53-AAK)

Autoantikörper stellen Antikörper dar, die gegen körpereigenes Gewebe, Hormone oder andere Antikörper gerichtet sind. [URL-20]

Die Selbsttoleranz ist durch die Produktion von Autoantikörpern gestört, da das „Selbst“ vom Immunsystem angegriffen wird. [URL-21]

Mutiertes p53-Protein kommt als tumorspezifisches Antigen vor und kann das Immunsystem aktivieren. Die Aktivierung des Immunsystems resultiert in der Synthese von im Plasma nachweisbaren AAK gegen dieses Protein. [URL-22] Diese Autoantikörper kommen nahezu ausschließlich bei Tumorpatienten vor. [URL-21]

Bei Ovarialkarzinom-Patientinnen bilden 20-40% Autoantikörper gegen das vom mutierten *TP53*-Gen produzierte p53. [Thierry Soussi, 2000]

P53-Autoantikörper werden als hochspezifische serologische Tumormarker verwendet. [URL-17] Da die Autoantikörper als Reaktion auf vorhandene Tumorzellen vom Immunsystem produziert werden und es somit zur Amplifikation des Signals kommt, scheinen Autoantikörper eine sensitivere Detektion von Tumorresten oder neu auftretenden Rezidiven zu ermöglichen. [Nicolaus, Häfner & Weiss et al., 2013]

1.3 Epigenetik – DNA-Methylierung

Epigenetik bedeutet definitionsgemäß „daraufgesetzte Genetik“ oder „außerhalb der üblichen Genetik“. Übliche Genetik heißt, dass es die DNA-Sequenz ist, die die Vererbung und die Funktion von Genen bestimmt. Bei der Epigenetik bestimmen im Gegensatz dazu Modifikationen von Nukleotiden und stabile Chromatin-Strukturen die Vererbung. Dazu gehören die Methylierung von Cytosin und die dichte Verpackung der Chromatin-Struktur sowie die zwischen den beiden ersteren vorliegenden engen Verflechtungen. [Knippers, 2006] Die Epigenetik beschäftigt sich mit dem Teil der Informationen der Zelle, die vererbt werden aber nicht Bestandteil der DNA sind. Epigenetische Mechanismen werden vermittelt durch chemische Modifikationen der DNA selbst oder der Proteine, die eng mit der DNA verbunden sind (Beeinflussung der Chromatin-Verpackung). [Jaenisch & Bird, 2003; Ramsahoye et al., 2000]

Die Grundlagen der Epigenetik basieren darauf, dass im Genom von Wirbeltieren und Pflanzen ein hoher Anteil methylierten Cytosins (5-Methylcytosin = 5. Base) vorliegt. Die Methylierung findet ausschließlich an Cytosin-Resten statt, welche in der Dinukleotid-Folge 5'-CpG-3' auftreten (CpG-Inseln). Bei der Deaminierung von 5'-Methylcytosin entsteht Thymin, was eine Mutation im Genom bedeutet. Um Mutationen zu vermeiden liegen im menschlichen Genom nur etwa 20 % der CpG-Folgen vor, die man aus statistischen Gründen erwarten würde. Die meisten der CpG-Inseln sind methyliert, vor allem in Transposons und in den sich wiederholenden Sequenzen von Centromer-Regionen. Es existieren relativ wenige CpG-Folgen in DNA-Regionen von einigen dutzend bis hundert Basenpaaren, die reich sind an CpG-Motiven (CpG-Inseln) sind. 50 % aller menschlichen Gene weisen an den Cytosinen in CpG-Inseln meist keine Methylierung auf, wenn die betroffenen Gene aktiv transkribiert werden, da die Methylierung von Cytosinen in CpG-Inseln eine Blockade der genetischen Aktivität verursacht. Die Gen-Expression wird durch die DNA-Methylierung beeinflusst, wenn die Methylgruppe am Cytosin in die große Rinne der DNA hinein ragt.

Die Auswirkungen umfassen die Verdrängung von Transkriptionsfaktoren, die normalerweise an die betreffende Sequenz binden, und die Bindung von Proteinen mit einer Affinität für methylierte DNA, sodass es in der Folge zu einer Verdichtung des Chromatins kommt (siehe Abbildung 12).

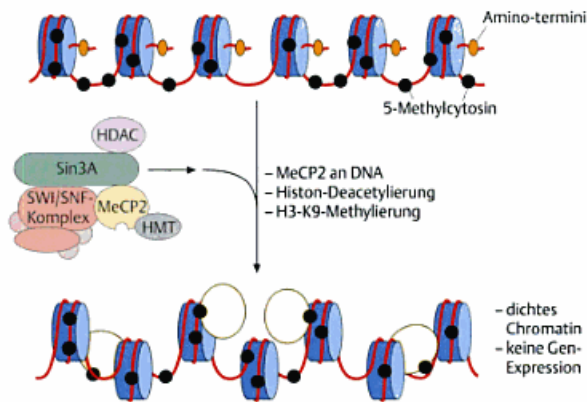


Abbildung 12 Konsequenzen der DNA-Methylierung [Knippers, 2006]

Massive Änderungen von Methylierungsmustern entstehen, wenn aus einer normalen Zelle eine Krebszelle wird. [Knippers, 2006]

Epigenetische Regulationsmechanismen sind wichtig für Entwicklung, Differenzierung und Proliferation der Zelle. Der epigenetische Status eines Genoms wird beeinflusst durch Krankheiten, Ernährung, Medikamenten-Einnahme, Alter und Geschlecht sowie einer Vielzahl anderer äußerer Umwelteinflüsse. In Säugern sind die CpG-Dinukleotide fast ausschließlich methyliert. [Ramsahoye et al., 2000; Jaenisch & Bird, 2003]

In somatischen Zellen sind ungefähr 80% der CpG-Inseln methyliert. Die Methylgruppe wird vom Methyl donor D-Adenosyl-Methionin übertragen und von verschiedenen DNA-Methyltransferasen (Dnmts) katalysiert. [Bestor TH, 2000]

Durch die Modulation epigenetischer Prozesse wird der zelluläre Phänotyp beeinflusst. Der Informationsgehalt eines Gens wird abgelesen und es kann seine Wirkung entfalten, wenn es aktiv abgelesen wird. An diesen Aktivierungen oder Inaktivierungen sind epigenetische Mechanismen beteiligt, sodass die Transkriptionsrate eines Gens vom Methylierungsmuster (Modifikationsmuster) der DNA abhängt. Dieser Vorgang unterliegt Enzymen, welche sich durch spezifische Modulatoren beeinflussen lassen.

Die Expression einzelner Gene innerhalb der kompletten genetischen Information eines Organismus weist Heterogenität auf, da bestimmte Genabschnitte häufiger als andere transkribiert werden. Durch den hohen Organisationsgrad der DNA (genetischen Information)

besteht die Möglichkeit den Phänotyp einer Zelle zu modifizieren ohne Einfluss auf den Genotyp zu nehmen. Die Veränderungen werden durch epigenetische Mechanismen realisiert, welche vor der eigentlichen Gentranskription liegen. Der Kodierungscode erfolgt über bestimmte Methylierungs- oder Histonmodifikationsmuster. [Biel et al., 2005]

DNA-Methylierungsprozesse haben große Bedeutung für die Regulation der Genexpression, für die Genomstabilität, für die Inaktivierung eines der beiden X-Chromosomen in weiblichen Säugern sowie beim mütterlich/väterlich geprägten Imprinting (monoallelische Genexpression). Weiterhin spielen Methylierungen eine Rolle in der Ätiologie vieler Krankheiten (besonders Krebs).

Ursächlich für die Entstehung von bösartigen Tumoren ist unter anderem die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (TSG) durch Mutation in der jeweiligen TSG-Sequenz oder durch die Induktion einer Epimutation (Methylierung) am TSG-Promotor. Mutationen bewirken funktionsunfähige Genprodukte und Epimutationen zur Supprimierung der Transkription. Der resultierende Phänotyp (hier Krebs) ist für beide Mutationen identisch, allerdings besteht ein medizinischer Unterschied, nach dem Epimutationen im Gegensatz zu Mutationen mithilfe konventioneller Therapien (Arzneimittel, Diät) umkehrbar sind. [Beck & Olek, 2003]

Anomale DNA-Methylierungen in Promotor-Regionen führen zur Entstehung von Tumoren. [Baylin & Jones, 2011] Untypische DNA-Methylierungen umfassen fehlerhafte Methylierungen im Anschluss an die Replikation, De-novo-DNA-Methylierungen oder falsche DNA-Reparaturmechanismen. [Momparker, 2003] Epigenetische Abnormitäten sind an der Entwicklung von Krebs (Karzinogene) beteiligt. Dadurch werden Onkogene aktiviert, Tumorsuppressorgene stillgelegt, chromosomale Instabilitäten gefördert und DNA-Reparatursystem inaktiviert. Methylcytosine sind tumor-erzeugend, da die Mutationsfrequenz von Methylcytosinen durch spontane hydolytische Deaminierungen ungefähr zehnfach höher liegt als bei nicht-methylierten Cytosinen. Außerdem haben Methylcytosine einen Beitrag an Punktmutationen, die innerhalb der Keimbahn und in somatischen Zellen entstehen. Etwa 50% aller inaktivierenden Punktmutationen in den kodierenden Regionen des humanen TP53-Tumorsuppressorgens finden an methylierten Cytosinen statt. [Rideout WM III, Coetzee GA, Olumi AF et al., 1990] Während der Zelltransformation finden genomweite Hypomethylierungen und regionale Hypermethylierungen von CpG-Inseln statt. [Jaenisch & Bird, 2003]

Eine Abnahme genomischer Methylierung kann sehr früh in bösartigen Tumoren erkannt werden, sogar bevor sich der Tumor ausbildet. [Chen RZ, Petterson U, Beard C et al., 1998]

2 Zielstellung

Das Ziel dieser Arbeit ist die Analyse von intratumoralen Immunzellpopulationen bei p53-Autoantikörper-positiven bzw. -negativen Ovarialkarzinompatientinnen.

Ovarialkarzinome weisen häufig Mutationen innerhalb des Tumorsuppressorgens p53 auf. Dies führt in der Mehrzahl der Fälle zu einer Akkumulation des mutierten, defekten Proteins. Einige Ovarialkarzinompatientinnen zeigen eine Autoimmunreaktion gegen p53. Die dabei nachweisbaren Autoantikörper (p53-AAK) können als Tumormarker für Diagnose bzw. Kontrolle des Krankheitsverlaufes verwendet werden. Unabhängig davon stellt sich die Frage warum nur ein Anteil der Patientinnen mit p53-Mutationen solche Autoantikörper aufweist.

Um dies näher zu untersuchen wurde bereits eine Gruppe von Patientinnen auf Veränderungen des p53-Proteins (Mutations-, Expressionsanalyse) und das Auftreten von p53-Autoantikörper untersucht. Dabei ergaben sich keine generellen Unterschiede zwischen p53-Autoantikörper-positiven und -negativen Patientinnen.

Das Vorkommen von intratumoralen und extratumoralen Immunzell-Populationen wurde innerhalb der Praxismodulararbeit bereits mithilfe der Methode immunhistochemischer Gewebe-Färbungen untersucht und ein statistischer Zusammenhang zwischen CD8-positiven Zellen (zytotoxische T-Zellen) und dem AAK-Status gefunden. Außerdem ist es gelungen für ein Kollektiv von 49 Patientinnen die Immunhistochemie zu etablieren.

In der hier vorliegenden Arbeit soll die Immunzell-Population der Makrophagen in den Geweben analysiert werden, da sich die Anfärbung der Makrophagen mit einem gegen das CD14-Antigen gerichteten Primärantikörper unspezifisch verhielt. Das Ziel ist die Etablierung der immunhistochemischen Färbung für CD163 um die Beteiligung von Makrophagen an der Ausbildung einer anti-p53 Immunantwort zu untersuchen.

Ein Nachteil der Immunhistochemie ist deren Subjektivität. Daher werden die gewonnenen Ergebnisse aus der Praxismodulararbeit mittels methylierungsspezifischer PCR und/oder anhand von Genexpressionsanalysen validiert.

3 Material

Neben dem allgemeinen Laborbedarf werden die in diesem Kapitel aufgeführten Materialien, Reagenzien und Geräte verwendet.

3.1 Geräte und Materialien

| | <u>Bezeichnung</u> | <u>Hersteller</u> |
|-----------------------------------|--|---|
| Abdeckfolie (96-Well-Platten) | BZO Seal Film | Greiner bio-one |
| Autoklav | | Münchner Medizin Mechanik GmbH |
| Dako Pen | | Dako, Hamburg; BRD |
| Deckgläser | 24x50 mm #1 (Stärke 0,13 - 0,16 mm) | Menzel |
| Drigalski-Spatel | | |
| Dunkelhaube (Geldokumentation) | Dark Hood DH-30/32 | Biostep, Jahnsdorf; BRD |
| Eismaschine | SPR 80 | Nordcap, Bremen; BRD |
| Elektrophorese-Kammer | | Boehringer-Ingelheim; BRD |
| Elektrophorese-Netzgerät | Powerpack P25 | Biometra, Göttingen; BRD |
| Falkons | 15 mL, 20 mL | Greiner bio-one |
| FACS-Gerät | BD Aria-II FACS | BD Biosciences Pharmingen TM |
| Feinwaage | | Sartorius |
| Gasbrenner | | Schütt-biotec GmbH; Göttingen, BRD |
| Gefriermikrotom | Cryotome FSE | Thermo Scientific |
| Gefrierschrank (-80°C) | | FormaScientific |
| Gefrierschrank (-20°C) | | Liebherr |
| Kamera zur Geldokumentation | | Olympus |
| Kamera Mikroskop | Axio Cam HRc | Zeiss |
| Kryoröhrchen | | Greiner bio-one |
| Kühlschrank (4°C) | | Liebherr |
| Küvette | | |
| Labor-Abzug | | toxicap® |

| | <u>Bezeichnung</u> | <u>Hersteller</u> |
|-------------------------------|---|--|
| Leucosep®-Röhrchen | 10 mL | Greiner bio-one |
| Mikroskop | Axioplan 2 | Carl Zeiss Mikroskope |
| Mikrowelle NN-T251W | | Panasonic |
| Objektträger | Superfrost®Plus | Thermo Scientific |
| Spektralphotometer | NanoDrop® ND-1000 | PEQLAB Biotechnologie GmbH |
| Spitzboden-Röhrchen | 15 mL | Greiner bio-one |
| PCR-Geräte | TouchDown TCS Hybaid | MWG-Biotech, Teddington; UK |
| | Mastercycler Gradient | Eppendorf; Hamburg, BRD |
| | Real-Time PCR System ABI 7300 SDS | Applied Biosystems; Darmstadt, BRD |
| Photometer | Lambda K | MWG-Biotech, Teddington; UK |
| Pipetten | | Gilson Eppendorf Reference Transferpette® S |
| Pipettenspitzen, gestopft | 200 µL | NerbePlus |
| | Neptune 10 µL/20 µL/ 100 µL/1000 µL | Kisker Biotech GmbH |
| | | |
| Pipettenspitzen, ungestopft | | Sarstedt; Brand; Roth (10 µL) |
| Reaktionsgefäße | 2,0 mL; 1,5 mL; 0,5 mL | Sarstedt |
| | 0,2 mL PCR SoftTubes | Biozym Scientific GmbH |
| | 8er Deckelkette (Multiply®-µStrip 0,2 mL Kette) | Sarstedt |
| | 96-Well-Platte PP-PCR-Plate, 96 Well, 0,2-mL Universal | Greiner bio-one |
| Schüttler für Flüssigkulturen | GFL 3015 | GFL Gesellschaft für Labor- technik mbH; |
| Burgwedel, BRD | | |
| Temperaturschüttler | Thermomixer 5437 | Eppendorf |
| | Thermomixer Comfort | Eppendorf |
| UV-Tisch | N90 LW 366 nm | Konrad Benda, Wiesloch; BRD |
| Vortexer (Mischgerät) | Whili-Mixer (50 Hz, 75 W, 220-240 V) Vortex-Genie 2 | Fisons Scientific Equipment Scientific Industries |
| Wippschüttler | Duomax1030 | Heidolph |

| | <u>Bezeichnung</u> | <u>Hersteller</u> |
|-------------|-----------------------------------|---------------------------------|
| Zentrifugen | Megafuge 1.0R | Haereus Instruments, Hanau; BRD |
| | Tischzentrifuge | Thermo Scientific |
| | Tischzentrifuge Centrifuge 5417 C | Eppendorf, Hamburg; BRD |
| | Tischzentrifuge Centrifuge 5427R | Eppendorf; Hamburg, BRD |

3.2 Chemikalien und Farbstoffe

| | | |
|---|--|--------------------------------|
| Agarose | Biozym LE Agarose Lot. No. 00100908C85613L | Biozym Scientific GmbH |
| Ammoniumacetat ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) | | Merck, Darmstadt; BRD |
| Ammoniaklösung | konzentriert 32% | Carl-Roth GmbH, Karlsruhe; BRD |
| Ampicillin | | Sigma; Deisenhofen, BRD |
| Antikörper- Verdünnungslösung | Antibody Diluent with Background Reducing Components (ready to use) (Bestell-Nr. S3022) | Dako |
| Bacto-Agar | | Difco, Detroit, Michigan; USA |
| Bacto-Trypton | | Difco, Detroit, Michigan; USA |
| Bacto-Hefeextrakt | | Difco, Detroit, Michigan; USA |
| Borsäure | | Carl-Roth GmbH, Karlsruhe; BRD |
| Bromphenolblau | | Carl-Roth GmbH, Karlsruhe; BRD |
| Chloroform | | Merck, Darmstadt; BRD |
| 5-Chlor-4-Brom-3-indolyl- β -D-Glactosid (X-Gal) | | Sigma, Deisenhofen; BRD |
| Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTP) 100 mM | | Roche Diagnostics GmbH |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Dimethyl-Sulfoxide M.W. = 78,13 Cat. No. 194819 Lot. No. R17183 | ICN Biomedicals, Inc |

| <u>Bezeichnung</u> | | <u>Hersteller</u> |
|--|---------------------------------------|-----------------------------------|
| Dithiotreitol (DTT) | | Invitrogen GmbH |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) | | Merck, Darmstadt; BRD |
| Eindeckmedium | Roti®-Histokitt II Roth T160.1 | Carl-Roth GmbH, Karlsruhe BRD |
| Ethanol 96% | | Carl-Roth GmbH, Karlsruhe; BRD |
| Ethanol 70% | | Carl-Roth GmbH, Karlsruhe; BRD |
| Ethidiumbromid 10 mg/mL | | Carl-Roth GmbH, Karlsruhe; BRD |
| Farbstoffe (qPCR) | | |
| Fluoreszenzfarbstoff | Sybr-Green 10x | Life Technologies |
| Referenzfarbstoff (Fluoreszenzfarbstoff) | Rox Reference Dye Lot. No. 1192617 | Invitrogen GmbH |
| Glycerin 100% | | Carl-Roth GmbH, Karlsruhe; BRD |
| Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) | | Boehringer, Mannheim; BRD |
| Kaliumchlorid (KCl) | | Merck, Darmstadt, BRD |
| Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄) | | |
| β-Mercaptoethanol | | Sigma-Aldrich GmbH |
| Magnesiumchlorid (MgCl ₂) | 25 mM Lot. No. R 11026 | Applied Biosystems |
| Natriumchlorid (NaCl) | | Carl-Roth GmbH, Karlsruhe; BRD |
| di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄) | | Merck, Darmstadt, BRD |
| Natriumhydroxid | | Carl-Roth GmbH, Karlsruhe; BRD |
| Paraformaldehyd | | Carl-Roth GmbH, Karlsruhe; BRD |
| Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) | | Carl-Roth GmbH, Karlsruhe; BRD |

| | <u>Zusammensetzung/ Bezeichnung</u> | <u>Hersteller</u> |
|---|--|-----------------------------------|
| Salzsäure (HCl) | | Carl-Roth GmbH, Karlsruhe; BRD |
| SDS (Sodiumdodecylsulfat) | | Carl-Roth GmbH, Karlsruhe; BRD |
| Separationsmedium | Ficoll-Paque™-Plus; dunkel gelagert | Amersham Biosciences |
| Tris-Hydroxymethylaminomethan (Tris) | | Carl-Roth GmbH, Karlsruhe; BRD |
| Tween [®] 20 | | Sigma-Aldrich |
| Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) | | Carl-Roth GmbH, Karlsruhe; BRD |
| Xylol | | Carl-Roth GmbH, Karlsruhe; BRD |

3.3 Lösungen und Puffer

| | | |
|--|---|---|
| Ammoniakwasser | auf 1 L aqua dest. 1 ml konzentrierte 32%-ige Ammoniaklösung geben (unter Abzug ansetzen!) | |
| Eosin-Lösung | Bestellnummer: HT110116 500 ml; gebrauchsfertig | Sigma – Aldrich |
| Hämatoxylin (Zellkern-Färbung) | 0,5 g Hämatoxylin 0,1 g Kaliumiodat 25 g Kaliumaluminium- Sulfat-Dodecahydrat 25 g Chloralhydrat 0,5 g Zitronensäure | Merck 4302 Roth P 751.2 Kalialaun; Roth P 724.2 Roth K 318.1 Sigma C-7129 |
| 5-First-Strand Buffer (Reverse Transkription) | | Invitrogen GmbH |
| Ladepuffer (6x) | 0,5M Tris-HCl (pH=6,8) 3ml Glycerin 1g SDS 600 mM DTT Spatelspitze Bromphenol-Blau | |

| | <u>Zusammensetzung/ Bezeichnung</u> | <u>Hersteller</u> |
|--|---|--------------------------------------|
| Phosphate Buffered Saline (10x PBS-Waschpuffer) | 80g NaCl 2g KCl 11,5g Na ₂ HPO ₄ 2g KH ₂ PO ₄ ad 1L aqua dest. | |
| Peroxidase- Blockierungslösung | 0,6% H ₂ O ₂ in 1x TBST Waschpuffer 98 ml 1x Waschpuffer + 2 ml 30%-iges H ₂ O ₂ → 0,6 %-iges H ₂ O ₂ Lösung immer frisch ansetzen und sofort verwenden | |
| PCR-Mix | FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) 2 x konzentriert 04913914001 | Roche Diagnostics GmbH |
| PCR-Puffer 10x AmpliTaQ Gold® | 15 mM MgCl ₂ Lot. No. R09952 | Applied Biosystems |
| 4% PFA-Fixierungslösung (Paraformaldehyd) | 10ml 2M Tris/HCl pH7,6 15ml 4M NaCl mit aqua dest. auf 350 mL auffüllen; 16 g festes Paraformaldehyd Lösen des Paraformaldehyds: - Lösung unter Rühren auf max. 45°C erwärmen - NaOH (Paraformaldehyd löst sich bei pH 11) auf 400 mL mit aqua dest. auffüllen mittels HCl pH-Wert von 7,6 einstellen Lösung ca. 4 -8 Wochen verwendbar, Lagerung bei 4 °C | |
| Puffer (DNA-Ligase) (Ligationsmix) | 10x Buffer for T4 DNA-Ligase + 10 mM ATP Amt: 0,5 mL Lot. No.: 0010810 | New England BioLabs, Beverly; USA |
| Puffer (Restriktionsenzyme) | | New England BioLabs, Beverly; USA |

| | <u>Zusammensetzung/ Bezeichnung</u> | <u>Hersteller</u> |
|--|--|--------------------------------------|
| BSA | Purified BSA 100x 10 mg/mL Amt: 0,25 mL Lot. No. 0351109 | |
| CutSmart | 10x konzentriert Amt: 1,25 mL Lot. No.: 0071305 | |
| NEBuffer 2 | 10x konzentriert Amt: 1,5 mL Lot. No.: 0020910 | New England BioLabs, Beverly; USA |
| NEBuffer 3 | 10x konzentriert Amt: 1,5 mL Lot. No.: 0081107 | |
| NEBuffer 3.1 | 10x konzentriert Amt: 1,25 mL Lot. No.: 0011302 | |
| 10x TBST-Waschpuffer (Tris Buffered Saline + Tween) | 250ml 2M TRIS-HCl; pH7,6 (mit HCl pH 7,6 einstellen) 375ml 4M NaCl 10ml Tween 20 ad 1000mL aqua dest. Lagerung bei 4°C | |
| Elektrophoresepuffer TRIS-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer) 10x | 108 g Tris (890 mM) 55 g Borsäure (890 mM) 40 mL 0,5 M EDTA; pH 8,0 | |

3.4 molekularbiologische Reagenzien

| | <u>Zusammensetzung/ Bezeichnung</u> | <u>Hersteller</u> |
|-----------------------------|---|--------------------------------|
| Eselserum | | Santa Cruz Biotechnology |
| <i>Escherichia coli</i> K12 | Stamm: JM101 Genotyp: F' <i>traD36 proA⁺B⁺ lacI^q Δ</i> (<i>lacZ</i>)M15/ Δ(<i>lac-proAB</i>) <i>glnV thi</i> | Labor für Gyn. MolBio, Jena |

Tabelle 4 Primärantikörper für immunhistochemische Färbung

| Anti-körper | Spezies | Ausgangs-konzentration | Arbeits-konzentration | Klon | Firma |
|--------------|------------------------------------|------------------------|---------------------------|------------|-----------------------------------|
| CD4 | monoklonal, Maus, Anti-Human | 31,25 µg/ml | 1:100 (= 0,3125 µg/ml) | RPA-T4 | BD Biosciences Pharmingen™ |
| CD8 | monoklonal, Maus, Anti-Human | 31,25 µg/ml | 1:100 (= 0,3125 µg/ml) | HIT8a | BD Biosciences Pharmingen™ |
| FoxP3 | monoklonal, Maus, Anti-Human | 500 µg/ml | 1:400 (= 1,25 µg/ml) | 236A/E7 | eBioscience Inc. San Diego, CA |
| CD14 | monoklonal, Maus, Anti-Human | 500 µg/ml | 1:200 (= 2,5 µg/ml) | 61D3 | eBioscience Inc. San Diego, CA |
| CD20 | monoklonal, Maus, Anti-Human | 500 µg/ml | 1:200 (= 2,5 µg/ml) | 2H7 | eBioscience Inc. San Diego, CA |
| CD163 | monoklonal, Maus, Anti-Human | 500 µg/ml | 1:400 (= 1,25 µg/ml) | eBioGHI/61 | eBioscience Inc. San Diego, CA |
| p53 | monoklonal, Maus, Anti-Human | 241 µg/ml | 1:200 (= 1,205 µg/ml) | DO-7 | Dako |

3.5 Enzyme, Plasmide, DNA-Standards, Antikörper, Nukleinsäuren

| | | |
|--|--|--------------------------------------|
| CpG Methyltransferase | CpG MTase M. SssI 4.000 U/mL=4 U/µL Amt: 0,025 mL Lot. No.: 0301310 | New England BioLabs, Beverly; USA |
| S-Adenoysl-Methionin (SAM) (Substrat Methyltransferase) | 32 mM Amt: 0,1 mL Lot. No.: 0951312 | New England BioLabs, Beverly; USA |
| DNA-Standard | GeneRuler™ 1kb Plus DNA-Ladder (0,1 µg/µL) | Fermentas GmbH |

| | <u>Zusammensetzung/ Bezeichnung</u> | <u>Hersteller</u> |
|-----------------------|--|--------------------------------------|
| DNA-Ligase | T4 DNA-Ligase 400.000 U/mL Amt: 0,05 mL Lot. No.: 0991002 | New England BioLabs, Beverly; USA |
| λ-DNA | Ursprung: λ-Phage (unmethyliert) | Promega; USA |
| Restriktionsenzyme | | New England BioLabs, Beverly; USA |
| NotI | 10.000 U/mL Amt: 0,05 mL Lot. No.: 0521212 | |
| PsiI | 5.000 U/mL Amt: 0,04 mL Lot. No.: 0091207 | |
| PstI | 20.000 U/mL Amt: 0,5 mL Lot. No.: 0411205 | |
| TaqαI | 20.000 U/mL Amt: 0,2 mL Lot. No.: 0541207 | |
| RNAseOUT™ | Recombinant Ribonuclease Inhibitor | Invitrogen GmbH |
| Reverse Transkriptase | SuperScript® II 10.000 Units, 200 U/μL | Invitrogen GmbH |
| Taq-Polymerase | AmpliTaq Gold® 250 Units, 5 U/μL Lot. No. 1404003 | Applied Biosystems |

3.6 Primer

Die Sequenzen der Oligonukleotid-Primer wurden mittels des Programms „PrimerExpress“ von LifeTechnologies erstellt. Die Herstellung für die GOI erfolgte durch die Firma Eurofins Genomics.

Tabelle 5 Primer-Daten

Forward Primer, R: Reverse Primer, Tm: Annealing-Temperatur für qPCR

| | Primer | Typ | Sequenz (5'-3') | T _A in °C |
|-----------------------|---|-----|---|----------------------|
| House-keeping-Gen | <i>GAPDH3'</i> | F | GGT GAA GGT CGG AGT CAA CG | 60,0 |
| | | R | CAA AGT TGT CAT GGA TGA CC | |
| | <i>β-Aktin</i> | F | GCA GTG ATC TCC TTC TGC AT | 60,0 |
| | | R | GGA CTT CGA GCA AGA GAT GG | |
| Genes of Interest | FoxP3-Promotorbereich | F | GGC CAG ATG GAC ATC ACC TA | 58,0 |
| | | R | TTC TCA GAC AGG GAC ATG GA | |
| | FoxP3 M-PCR | F | GAT TTA GAG GGT CGG GTT GGG TAG TC | 58,0/60,0/62,5 |
| | | R | CGA CCG CCA TAA CGT CAA TAA CG | |
| | FoxP3 NM-PCR | F | GAT TTA GAG GGT TGG GTT GGG TAG TT | 58,0/60,0/62,5 |
| | | R | CAA CAC ATC CAA CCA CCA TAA CA | |
| | CD8-Genabschnitt, Exon-überspannend; verschiedene Spleißvarianten | F | GAG CCC CGA GCT GAC CTT | 58,0/60,0/62,0 |
| | | R | CCG GCA CAC TCT CTT CTT GAG | |
| Reverse Transkription | CDS (poly dT-Primer) | | AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GTA C(T) ₃₀ VN | - |
| Sequenzierung | rekombinantes Plasmid: pGEM®-T Vector System I + FoxP3-Insert | F | GTA AAA CGA CGG CCA GT | - |
| | | R | AAC AGC TAT GAC CAT G | - |

Gene of Interest:

FoxP3-Genabschnitt

Forward: 3088-FoxP3-clon F (H 514 27-54 19-318)

Reverse: 3089-FoxP3-clon R (H 514 27-5419-418)

Eurofins Genomics MWG

GmbH, Ebersberg; BRD

FoxP3 MPCR

Forward: 3090-FoxP3-M-F (H 516 27-5419-518)

Reverse: 3091-FoxP3-M-R (H514 27-5419-618)

Eurofins Genomics

GmbH, Ebersberg; BRD

FoxP3 NMPCR

Forward: 3092-FoxP3-UM-F (H 516 27-5419-718)

Reverse: 3093 FoxP3-UM-R (H 514 27-5419-818)

Eurofins Genomics MWG

GmbH, Ebersberg; BRD

CD8

Forward: 3086-CD8-F (H 514 27-5419-118)

Reverse: 3087-CD8-R (H 514 27-5419-218)

Eurofins Genomics MWG

GmbH, Ebersberg; BRD

Housekeeping-Gene:

β-Aktin
GAPDH3'

Sigma-Aldrich
Thermo Scientific

Reverse Transkription:

CDS (Poly dT-Primer)

ClonTech

Sequenzierung:

Plasmid pGEM®-T Vector System I + FoxP3-Genabschnitt

Foward: 766 M13F

Promega; USA

Reverse: 767 M13R

3.7 Plasmide

Für die Erstellung eines Plasmid-Standards wurde ein ausgewählter Teilbereich des ORF mittels PCR amplifiziert und in den Vektor pGEM®-T kloniert.

Plasmid-Vektor

pGEM®-T, Vector System I

Promega; USA

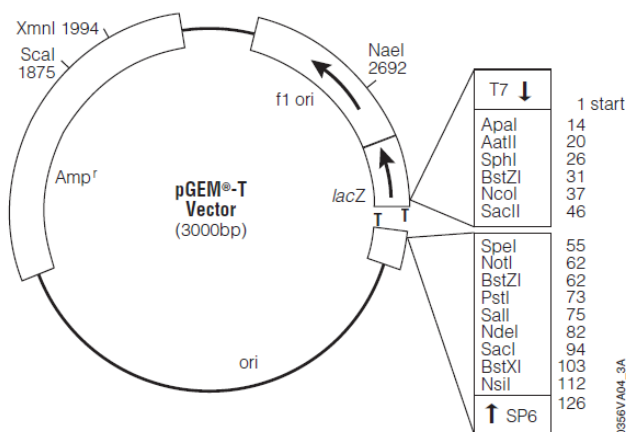


Abbildung 13 Vektor-System pGEMT

Tabelle 6 Elemente des Plasmids pGEM®-T Vector System I und deren Funktion [URL-23]

| Element | Nukleotid-Nr. | Funktion |
|-------------------------------------|--------------------|---|
| Multiple Cloning Site (MCS) | 10-113 | Klonierung des GOI in die MCS, lokalisiert downstream von der ori-Region |
| lacZ Start-Codon | 165 | Blau-Weiß-Selektion, zur Identifikation bakterieller Klone (Identifikation transgener Bakterien mit gewünschten Modifikationen) |
| Lac Operator | 185-201 | |
| β-Laktamase-Kodierungsregion | 1322-2182 | |
| Lac-Operon-Sequenzen | 151-380, 2821-2981 | |
| f1-ori | 2365-2820 | Replikationsursprung zur einzelsträngigen Replikation von f1-Phagen; Vermehrung mittels eines Helferphagen |
| ori-Region | | high-copy Replikation und Aufrechterhaltung des Plasmids in E. coli |
| Amp^r-Region | | Ampicillin-Resistenz zur Selektion (Resistenzmarker) |

3.8 Medien

| | <u>Zusammensetzung/ Bezeichnung</u> | <u>Hersteller</u> |
|-----------------------------------|--|-----------------------------------|
| Luria-Broth Medium (LB-Medium) | 10 g Bacto-Trypton 5 g Bacto-Hefeextrakt 5 g Natriumchlorid mit deionisiertem Wasser auf 1L auffüllen, mit 10 N NaOH-Lösung auf einen pH von 7,4 einstellen Autoklavieren (20 min, 3 bar, 121°C), Lagerung bei 4°C | Carl-Roth GmbH, Karlsruhe; BRD |
| Agarplatten | LB-Medium unter Zusatz von 1,5 % (w/v) Bacto-Agar Autoklavieren (20 min, 3 bar, 121°C), Gießen der Platten nach Abkühlen der Lösung auf ca. 50°C und Zufügen der zur Selektion notwendigen Antibiotika, Lagerung bei 4°C | |

3.9 Zelllinien

Tabelle 7 Überblick Zelllinien

| <u>Zelllinie</u> | <u>Morphologie</u> | <u>Ursprung</u> | <u>Referenz</u> |
|-------------------------|---------------------------|---|--|
| HaCaT | epithelial | humane Keratinozyten | Boukamp <i>et al.</i> , 1988 |
| HeLa | epithelial | Zervixkarzinom | Scherer W. F, Syverton J. T, Gey G. O. Journal Experimental Medicine 1953 |
| HPK II | epithelial | HPV-16-transfizierte Vorhautkeratinozyten (in-vitro immortalisiert) | Durst <i>et al.</i> , 1987b |
| A2780 | epithelial | humanes Ovarialkarzinom | Behrens <i>et al.</i> , 1987 Cancer Research |

3.10 Kits

| | | |
|-------------------------|--|--|
| Immunhistochemie | REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB ⁺ , Rabbit/Mouse | Dako |
| DNA-Aufreinigung | InnuPREP DOUBLEpure Kit Biometra, REF 845-KS-5050250 Lot. No. 017-13 | Analytik Jena- Jena; BRD |
| ELISA | „p53-Autoantikörper ELISA ^{plus} “; Kat.-Nr. p53 Aak; Datenblatt- Version: 014-09.07.2010 | Steinbeis Transferzentrum für Angewandte Biologische Chemie, Mannheim; BRD |
| Plasmid-Minipräparation | Plasmid DNA purification Kit REF 74058850 Lot. No. 1312/004 | Macherey Nagel GmbH & Co. KG, Düren; BRD |

| | <u>Zusammensetzung/ Bezeichnung</u> | <u>Hersteller</u> |
|--------------------------------|--|--|
| DNA-Bisulfit-Behandlung | EZ DNA Methylation-Gold™Kit Lot. No. ZRC 173469 | Zymo Research, Irvine; USA |
| RNA-Isolation u. -Aufreinigung | RNA Isolation Nucleo Spin®RNA | Macherey Nagel GmbH & Co.KG, Düren; BRD |

3.11 Probenmaterial

Als biologisches Probenmaterial wurde kryokonserviertes Biopsie-Material(Ovarialkarzinom) und Blutserum von 46 Ovarialkarzinom-Patientinnen verwendet. Dieses stammt aus dem Universitätsklinikum Jena– Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe.

| | | |
|---|---|--------------------------------|
| Abstrich-DNA | Histologie: unauffällig | UFK, Jena |
| DNA-Proben | UM menschliche reine DNA, 10 ng/µL EpiTect® M BS-behandelte menschliche DNA, 10 ng/µL EpiTect® UM BS-behandelte menschliche DNA, 10 ng/µL EpiTect® | Qiagen, Hilden; BRD |
| DNA-Proben u. Gefrierewebe von Ovarialkarzinom-Patientinnen | | UFK, Jena |
| peripheres Blut + Koagulationshemmer Heparin | | |
| Tonsillen-Gewebe | | Labor für Gyn. MolBio, Jena |

3.12 Software

| | | |
|--|---|--------------------|
| Bildverarbeitungssoftware (Mikroskop) | AxioVision | Zeiss |
| Excel® 2003 | | Microsoft |
| Office PowerPoint® | | Microsoft |
| Primerprogramm | „PrimerExpress“ | LifeTechnologies |
| Software ABI7300 | Sequence Detection Software Version 1.2 (7300 System SDS software Core Application) | Applied Biosystems |
| Software für FACS-Gerät | FACSDiva Version 6.1.3 | BD Biosciences |
| Statistik- und Analyse-Software | IBM SPSS Statistics Statistica | IBM StatSoft |

4 Methoden

Die Methoden werden anhand der Protokolle des Labors für Gynäkologische Molekularbiologie (Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe – Universitätsklinikum Jena) oder nach den Protokollen der jeweiligen Kits durchgeführt. Abweichungen von den Standardprotokollen sind im Text jeweils angegeben.

4.1 Immunhistochemische/Immunzytochemische Färbung von Gefrierschnitten

4.1.1 Vorbereitung der Lösungen

Die Gewebe müssen zwischen den einzelnen Arbeitsschritten gewaschen werden. Dafür wird TBST-Waschpuffer verwendet, der nach den Angaben aus dem Kapitel Material – Lösungen und Puffer hergestellt wird. Zum Spülen und Waschen der Objektträger muss der 10x Waschpuffer 1:10 verdünnt werden um einen 1x Waschpuffer zu erhalten.

Die Herstellung der 4%-igen Paraformaldehyd-Fixierungslösung wird nach den Angaben siehe Kapitel Material – Lösungen und Puffer hergestellt. Die Lösungen TRIS/HCl und NaCl werden gemischt und mit aqua dest. auf ein Volumen von 350 ml aufgefüllt sowie 16 g festes Paraformaldehyd zugegeben. Das Paraformaldehyd-Pulver wird unter Erwärmen und durch Zugabe von NaOH gelöst (pH-Wert 11).

Hämatoxylin ist ein basischer Farbstoff, der sich in den Kern von Zellen, genauer in die negativ geladene DNA, unspezifisch einlagert. Für die Hämatoxylin-Lösung werden 0,5 g festes Hämatoxylin in 5 ml absoluten Ethanol (abs. EtOH) gelöst und auf 500 ml mit aqua dest. aufgefüllt. Durch das Zugabe von 25 g Kaliumaluminiumsulfat (Kalialaun), einem Oxidanz, wird die Oxidation (Reifung) des Hämatoxylins zum leicht sauren Farbstoff Hämatein (Hämalaun, Hämatoxylinlack) hervorgerufen. Das Aluminiumsalz wirkt als Beizmittel. Die Mischung aus Hämatoxylin und dreiwertigen Metallsalzen bildet den sog. Hämatein/Hämatoxylinlack führt zur selektiven Anfärbung der Kern-DNA. Hämatein ist der wirksame Farbstoff, der sich in die negativ geladene DNA unspezifisch einlagert, indem mehrwertige Kationen mit den anionischen Strukturen (Phosphatgruppen der Nukleinsäuren) Chelate bilden. Die Kombination aus kovalenter und koordinativer Bindung ist ausreichend stabil um Spülungen in Wasser und Alkohol standzuhalten. Die Chelatverbindungen werden im sauren Milieu verwendet und bilden durch Spülen in Leitungswasser oder leicht basischem Ammoniakwasser (schwache Base) die charakteristische blaue Farbe aus (Bläuen). Das heißt die Färbung der Gewebe erfolgt in saurer Lösung und durch Spülen in Leitungswasser oder schwachen Basen erfolgt die Umwandlung des Hämateinlacks nach blau.[URL-24; URL-25]

[Lang, 2006] Außerdem ist es möglich der Hämatoxylin-Lösung 0,1 g Natriumiodat zuzugeben, das ebenfalls als Oxidationsmittel wirkt und das Hämatoxylin in den wirksamen Farbstoff Hämatein umgewandelt. [URL-26]

Kaliumaluminiumsulfat und Natriumiodat müssen sich vollständig lösen, bevor 25 g Chloralhydrat und 0,1 g Citronensäure zugegeben werden. Chloralhydrat wirkt als Stabilisator um ein Überoxidieren der Lösung und eine Besiedlung mit Bakterien zu vermeiden. Die Zugabe einer Säure (Citronensäure) beeinflusst den pH-Wert der Farblösung. [Lang, 2006] Die fertige Lösung wird durch einen Faltenfilter filtriert. Die Lösung ist ca. 2 Monate verwendbar, was vom Färbeergebnis abhängt, da die Hämatoxylin-Lösung nach jeder Färbung wieder verwendet wird. Der Farbstoff wird bei Raumtemperatur gelagert.

Das Ammoniakwasser wird durch Mischen von 1 ml konzentrierter Ammoniaklösung (32%-ig) mit 1L aqua dest. hergestellt. Die Lösung ist durch Lagerung bei RT (Raumtemperatur) ca. 1 Jahr verwendbar. Durch die Zugabe von Ammoniakwasser wird der pH-Wert angehoben und die rötlich-braun gefärbten Strukturen erscheinen blau-violett. Dieser Schritt führt außerdem zur Fixierung der Farbe an den Zielstrukturen. [URL-27]

4.1.2 Vorbereitung der Gefrierschnitte

Die eingefrorenen Gewebestücke werden mit dem Gefriermikrotom geschnitten. Die Gewebeschnitte der Ovarialkarzinom-Patientinnen, mit einer Dicke von 7µm, werden auf Objektträger (Superfrost®Plus) aufgebracht, kurz an der Luft getrocknet und bei -80°C eingefroren. Durch die Trocknung wird vermieden, dass das Wasser in den Zellen während des Einfrierprozesses Eiskristalle bildet und diese das Gewebe schädigen.

Nach dem Auftauen der Proben werden diese beschriftet. Mit einem Wachsstift (Dako-Pen) wird um jeden Gewebeschnitt ein hydrophober Ring auf den Objektträger gezogen, durch den ein Entweichen der aufzubringenden Reagenzien vermieden werden soll. Die Schnitte werden in einer Küvette 10 min in kaltem 4 %-igem Paraformaldehyd fixiert. Es bildet sich eine Netzstruktur zwischen den Zellen des Gewebes aus und es findet eine biologische Reaktivierung statt. Durch die Behandlung mit Paraformaldehyd-Lösung (PFA-Lösung) verändert sich die Morphologie der Gewebeschnitte während des Protokolls nur unwesentlich. Nach zweimaligem Spülen mit 1x TBST-Waschpuffer werden die Gefrierschnitte 7 min in 0,6%-iger H₂O₂-Lösung inkubiert (Peroxidase-Blockierungslösung). Pro Küvette werden 100 ml 0,6%-ige Wasserstoffperoxid-Lösung benötigt. Dazu werden 2 ml 30%-iges Wasserstoffperoxid in 98 ml 1x Waschpuffer gelöst. Die Lösung muss immer frisch hergestellt und sofort verwendet werden. Das Wasserstoffperoxid vermittelt die Blockierung der endogenen Peroxidasen, um

eine falsch positive Reaktion zu vermeiden. Unspezifische Färbungen resultieren aus der Reaktion zwischen endogenen Peroxidase-Enzymen in der Zelle und der am Ende zugegebenen Chromogen-Substratlösung.

Mittels Waschpuffer werden die Objektträger zweimal gespült, anschließend 5 min gewaschen und dabei auf dem Wippschüttler gleichmäßig geschwenkt.

4.1.3 Färbeverfahren

Die Färbung der Schnitte erfolgt mit dem „REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB⁺, Rabbit/Mouse“ der Firma DAKO. Um unspezifische Färbungen zu vermeiden, kann auf den Gewebeschnitten Ziegenerum für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert werden. Die polyklonalen Antikörper im Ziegenerum sättigen alle unspezifischen Bindestellen ab, die von Ziegen-Antikörpern im humanen Gewebe gebunden werden können. Damit wird vermieden, dass der Sekundärantikörper unspezifisch an gewebeeigene Proteinantigene bindet, sondern nur spezifisch an den Primärantikörper. Das Ziegenerum wird von den Objektträgern abgeklopft. Durch die hohe Spezifität der verwendeten Sekundärantikörper ist es unnötig gewesen das Ziegenerum auf den Gewebeschnitten anzuwenden.

Die Objektträger werden nach dem Waschschrift mit TBST-Lösung (TRIS Buffered Saline + Tween) abgeklopft und in einer feuchten Kammer gelagert um Austrocknungen zu vermeiden. Der vorbereitete optimal verdünnte Primärantikörper aus Maus oder Kaninchen wird über Nacht bei 4°C (Lagerung im Kühlschrank) auf den Schnitten inkubiert. Dazu wird der Primärantikörper mit der Antikörper-Verdünnungslösung entsprechend verdünnt, gevortext und kurz bei ungefähr 5000 U/min an zentrifugiert. Pro Gewebeschnitt werden 70 µl verdünnte Antikörperlösung angewendet. Als Negativkontrolle wird die Antikörperverdünnungslösung auf die Schnitte gegeben und ebenfalls bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach der Inkubation werden die Objektträger abgeklopft und es wird dreimal für 5 min mit 1x TBST-Waschpuffer gewaschen. Dabei wird die Küvette auf dem Wippschüttler gleichmäßig geschwenkt.

Auf den Schnitten wird über eine Dauer von 30 min innerhalb der feuchten Kammer der gebrauchsfertige Sekundärantikörper, der mit HRP konjugiert ist, angewendet. Bei diesem handelt es sich um ein Dextranmolekül, an das verschiedene Antikörper gebunden sind, die in der Ziege hergestellt werden und gegen den konstanten Teil von IgG-Molekülen aus Maus oder Kaninchen (Primärantikörper) gerichtet sind. Daher ist der Sekundärantikörper zur Anwendung gegen primäre Kaninchen- und Maus-Antikörper geeignet. Außerdem sind an das Dextran-Polymer Peroxidasen (HRP) gekoppelt, die nach Zugabe der Substrat-Lösung (3,3'-Diaminobenzidin) eine Enzym-Substrat-Reaktion auslösen.

Die Objektträger werden dreimal 5 Minuten in Waschpuffer gewaschen und dabei auf dem Wippschüttler positioniert. Mit der vorbereiteten Chromogen-Substratlösung werden die Gewebeschnitte für maximal 10 min in der feuchten Kammer inkubiert. Auf jede Schnittprobe werden 100 µl der 1:50 verdünnten Substrat-Chromogen-Lösung pipettiert. Die Substratlösung wird in der Pufferlösung verdünnt. Bei dem Substrat handelt es sich um 3,3'-Diaminobenzidin (DAB), welches unter Lichteinfluss leicht zerfällt und dementsprechend dunkel gelagert werden muss. Die Enzym-Substrat-Reaktion findet zwischen dem an dem sekundären Antikörper konjugierten Enzym Meerrettich-Peroxidase und dem Substrat DAB statt. Während des Protokolls ist DAB stabil unter Lichteinfluss.

Die Schnitte werden anschließend gründlich dreimal in aqua dest. gespült.

4.1.4 Gegenfärbung der Zellkerne

Zur Anfärbung der Zellkerne wird Hämatoxylin-Lösung genutzt, die in die Küvette gegeben wird, bis die Objektträger bedeckt sind. Die Inkubationszeit beträgt 5 min. Die Objektträger werden mit Leitungswasser gespült bis die Farbwolken auf den Objektträgern verschwunden sind. Um die Zellkerne zu bläuen, wird Ammoniakwasser ca. 1 min an den Gefrierschnitten angewendet. Das Ammoniakwasser wird entfernt und die Objektträger gründlich mit aqua dest. gespült.

Um die Gewebeproben mit Eindeckmedium einzudecken und haltbar zu machen, müssen die Zellen schrittweise dehydriert werden. Dazu wird die aufsteigende Ethanol-Reihe angewendet – jeweils 2 min 50%-iges Ethanol, 70%-iges Ethanol, 96%-iges Ethanol I, 96%-iges Ethanol II und jeweils 5 min 100 %-iges Ethanol I, 100%-iges Ethanol II, Ethanol/Xylol (50:50 Mischung), Xylol I, Xylol II. Das schrittweise Entfernen von Wasser aus den Zellen mittels Ethanol und dessen Herausziehen mithilfe von Xylol erlaubt die Anwendung eines Eindeckmediums auf Lösemittel-Basis. Mithilfe von Roti®-Histokitt II werden die Schnitte eingedeckt.

4.1.5 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) ist eine Übersichtsfärbung, die einen Überblick über die Gewebestruktur verschafft. Man kann mit dieser Färbung untersuchte Strukturen in normal, entzündlich, degeneriert-verändert oder pathologisch unterscheiden. Es handelt sich um eine Kombinationsfärbung. Hämatoxylin wirkt, trotz seines anionischen Ursprungs, als basischer Farbstoff. Der positiv geladene Farbstoff Hämalun lagert sich an die negativ geladenen Komponenten des Kerns (DNA und RNA) und färbt sie blau an, da der Farbstoff eine Bindung mit diesen basophilen Phosphatgruppen eingeht. Eosin ist ein saurer Farbstoff, der an

die positiv geladenen (azidophilen) Komponenten der Zellen (Zytoplasma) bindet. [Graumann & Sasse, 2003]

Die HE-Färbung hat Bedeutung als Sukzedanfärbung, bei der die Farbstoffe nacheinander auf einen Gewebeschnitt einwirken und es im Ergebnis zur differenzierten Anfärbung verschiedener Gewebeteile (Zellkern, Zytoplasma) kommt. Bei dieser Mehrfachfärbung färbt Hämalaun das Präparat diffus an und durch den zweiten Farbstoff Eosin kommt es an bestimmten Stellen zu einer Überlagerung. Das mit Hämalaun-Eosin gefärbte Präparat erscheint blau und rot, weil die Zellkerne mit Eosin angefärbt werden und ihre Rotfärbung im fertigen Präparat durch die Blaufärbung mit Hämalaun überdeckt wird. [URL-26] Als progressive Färbung muss der Hämalaun-Farbstoff so lange einwirken bis der gewünschte Effekt erzielt wird, wobei nur geringe Farbstoffkonzentrationen notwendig sind. [URL-27]

Neben der immunhistochemischen Färbung der Ovarialkarzinom-Gewebe wird von jeder Probe eine HE-Färbung angefertigt.

Die Objektträger, mit den aufgebrachten Geweben, werden aufgetaut und an der Luft für einige Tage getrocknet, um diese auf dem Objektträger zu fixieren. Dadurch wird gewährleistet, dass sich die Schnitte während des Protokolls nicht ablösen. Die Gewebe werden zur Rehydrierung der Zellen mittels der absteigenden Ethanolreihe (jeweils 5 min in 96%-igem, 70%-igem und 50%-igem EtOH) behandelt. Die Küvette wird dabei auf einem Wippschüttler gleichmäßig geschwenkt. Die Schnitte werden anschließend 3- bis 4-mal in aqua dest. gespült.

Die 1. Färbung erfolgt mit Hämatoxylin für 2 – 5 min. Nach mehrmaligem Spülen mit Leitungswasser werden die Zellkerne durch Zugabe von Ammoniakwasser für 1 – 5 min gebläut. Beim Bläuen entsteht ein fester Farblack als Folge der pH-Verschiebung von sauer nach basisch, da das Ammoniakwasser basische Bestandteile aufweist. Diese stabilisieren und fixieren die Farbe und es erfolgt der Farbumschlag von rot nach blau. [URL-26] Die Objektträger werden 3- bis 4-mal mit aqua dest. gewaschen.

Für die 2. Färbung werden die Schnitte 2 min in alkoholischem Eosin inkubiert. Eosin wird zur Gegenfärbung verwendet und die verschiedenen Rottöne werden erreicht durch unterschiedlich starke Diffusion des Farbstoffs in das Zellzytoplasma. Eosin wird regressiv gefärbt, das heißt es wird überfärbt und dann je nach gewünschtem Färbungsgrad differenziert. [URL-28] Zur Differenzierung des Eosin-Farbstoffs wird 3- bis 4-mal in 70%-igem EtOH gespült. Um die Zellen zu entwässern wird jeweils 3- bis 4-mal in 96%-igem EtOH I und EtOH II gewaschen und jeweils 5 min in abs. EtOH I und abs. EtOH II auf dem Wippschüttler inkubiert. Die Entwässerung ist notwendig, da Eosin ein wasserlöslicher Farbstoff ist. Um den

Farbstoff nicht wieder heraus zu waschen, muss das Wasser aus den Zellen entfernt werden. [URL-28]

Zur nachfolgenden Entsprittung (Entzug von Ethanol) der Gewebe wird unter dem Abzug gearbeitet, da das verwendete Xylol leicht flüchtig ist. In einem EtOH/Xylol-Gemisch (50:50), Xylol I und Xylol II wird nacheinander jedes Mal für 5 min inkubiert. Die Gewebe werden mit dem Eindeckmedium Roti-Histokitt II (Roth) eingedeckt um sie haltbar zu machen.

Das Ergebnis der Übersichtsfärbung sind tiefblau angefärbte Zellkerne, rosarot gefärbtes Zytoplasma und verschiedene Rotintensitäten in den restlichen Strukturen der Zellen.

4.2 Arbeiten mit Bakterien

4.2.1 Klonierung/Ligation des PCR-Produkts – Generierung rekombinanter Plasmide

Der mittels PCR-Verfahren amplifizierte FoxP3-Genabschnitt (PCR-Produkt) wird zur Vervielfältigung in den Vektor (Plasmid) pGEM®-T Vector System I kloniert, mit dem das Bakterium *Escherichia coli* (JM 101) transformiert wird. Die Vektorkarte des Vektors pGEM® ist in Abbildung 14 dargestellt.

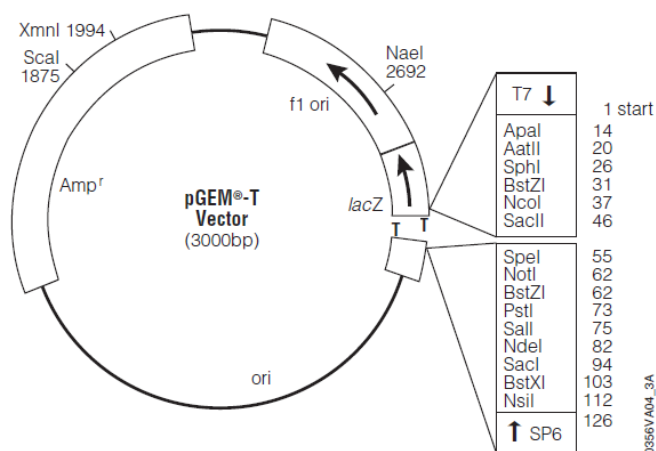


Abbildung 14 Plasmid pGEM-T Vector System I

Es werden die amplifizierten DNA-Fragmente (PCR-Produkt) aus Abstrich und HaCat-Zellen in das Plasmid pGEM®-T Vector kloniert. Plasmid und PCR-Produkt müssen dafür in einem Verhältnis von 1:3 vorliegen. Für den Klonierungsansatz werden eine Positivkontrolle und eine Background-Kontrolle mitgeführt. Als Positivkontrolle dient ein bekanntes DNA-Fragment, welches in das Plasmid eingebaut werden soll. In die Background-Kontrolle wird statt eines zu klonierenden DNA-Fragments Wasser eingesetzt. Für jeden der vier Klonierungsansätze werden 10 µl hergestellt, bestehend aus Master-Mix, aufgereinigtem PCR-Produkt (DNA) und/oder Wasser.

Der Ligationsmix wird nach Tabelle 8 hergestellt.

| Tabelle 8 Ligationsansatz | |
|---------------------------|----------------------|
| | Ligations-Ansatz 1 x |
| Ligation Buffer | 5 µl |
| Vector | 1 µl |
| Ligase | 1 µl |
| Reaktionsvolumen | 7 µl |

Der Ligationsmix wird zu je 7 µl auf die Reaktionsgefäße aufgeteilt und jeweils 2 µl DNA (aufgereinigtes PCR-Produkt) und 1 µl Wasser oder im Fall der Background-Kontrolle 3 µl Wasser dazugegeben (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9 Volumina Probe und aqua dest. für Ligationsansatz

| | Probe 1 | Probe 2 | Positivkontrolle | Background-Kontrolle |
|------------------------|---------|---------|------------------|----------------------|
| Ligationsmix-Mix | 7 µl | 7 µl | 7 µl | 7 µl |
| Wasser | 1 µl | 1 µl | 1 µl | 3 µl |
| PCR-Produkt (DNA) | 2 µl | 2 µl | 2 µl | - |
| Gesamtreaktionsvolumen | 10 µL | 10 µL | 10 µL | 10 µL |

Die Ligationsansätze werden bei 14 °C über Nacht im Thermocycler inkubiert.

4.2.3 Transformation von *Escherichia coli* (JM 101)

Bei einer Transformation wird freie DNA durch Bakterien aufgenommen und in ihrem Organismus vervielfältigt.

Die kultivierten, bereits kompetenten, Bakterien-Zellen (*Escherichia coli* K12 JM 101) werden bei -80 °C im Tiefkühlschrank aufbewahrt. Für die Transformation werden die Bakterien auf Eis aufgetaut und bei 0°C auf Eis gelagert. Zu 100 µl der kompetenten Zellen werden jeweils 10 µl Ligationsansatz gegeben (Transformationsansatz). Es folgt eine Inkubation über 45 min bei 0°C. Danach werden die Ansätze für 2 min bei 42 °C in den Thermomixer gestellt oder alternativ für 5 min im Brutraum bei 37 °C inkubiert. Der Hitzeschock verstärkt die Aufnahme der Plasmide in die Bakterienzellen. Zu den Transformationsansätzen werden jeweils 700 µl LB-Medium gegeben. Die Ansätze werden für 30 min in einem Schüttler (200 U/min) bei 37 °C (Brutraum) inkubiert.

Nach der Inkubation werden die Ansätze (LB-Medium + Transformationsansatz) kurz bei 1100 x g zentrifugiert. Von den 800 µl-Ansätzen werden jeweils 600 µl abpipettiert und verworfen. In den übrigen 200 µl wird das während der Zentrifugation entstandene Pellet resuspendiert. 100 µl der Lösung werden auf den Agar-Platten (vorbereitet mit X-Gal und IPTG) mittels eines

Drigalski-Spatels ausgestrichen. Die Platten werden über Nacht bei 37 °C im Brutraum inkubiert.

4.2.4 Blau-Weiß-Selektion

Die Blau-Weiß-Selektion ist ein Verfahren um eingebaute fremde DNA-Konstrukte in einem Plasmid innerhalb einer *E. coli*-Zelle nachzuweisen. Das Plasmid enthält einen Replikationsursprung (ori), ein Resistenzgen (bla), das eine Resistenz gegen Ampicillin vermittelt, und eine multiple Klonierungsstelle (engl. Multiple Cloning Site, MCS). Die MCS ist ein 100 bp langer Abschnitt innerhalb des lacZ-Gens, in dem mehrere Erkennungsstellen für verschiedene Typ-II-Restriktionsendonukleasen angeordnet sind. Bei einer Klonierung wird der Vektor innerhalb der MCS geöffnet und die Fremd-DNA hineinligiert.

Die Methode der Blau-Weiß-Selektion identifiziert positive *E. coli*-Kolonien, welche die Fremd-DNA tragen und ermöglicht eine Unterscheidung von positiven und falsch-positiven Klonen. Als falsch-positiv werden Klone bezeichnet, die Träger des (religierten) Plasmids sind und auf dem Selektionsmedium wachsen, aber nicht das gewünschte Insert in dem Vektor vorweisen.

E. coli-Bakterien werden mit den rekombinanten Plasmiden transformiert. Nachdem die Bakterien kultiviert sind, werden diese auf einem Nähragar mit Ampicillin und der chromogenen Substanz X-Gal ausplattiert. Über eine Selektion mittels Ampicillin überleben nur diejenigen Zellen auf dem Nährmedium und bilden Kolonien, die das Plasmid aufgenommen haben.

Die Blau-Weiß-Selektion identifiziert die Zellen, welche den Vektor mit Fremd-DNA in der MCS tragen. Das eingebrachte Plasmid vermittelt neben der Antibiotikaresistenz eine Komplementation des in den verwendeten *E. coli*-Stämmen deletierten lacZ α -Gens. Das Genprodukt des lacZ α -Gens, ein Teil des Enzyms β -Galactosidase, ist intakt, wenn kein DNA-Konstrukt in den Vektor eingebaut vorliegt. [Fuchs, Schlegel & Eitinger, 2007] X-Gal ist das chromogene Substrat der β -Galactosidase. Dieses Enzym ist in der Lage X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid) hydrolytisch in farblose Galaktose und 5-Brom-4-chlor-indoxyl zu spalten. Das 5-Brom-4-chlor-indoxyl wird vom Sauerstoff der Luft zum tiefblauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo oxidiert und die Kolonien färben sich blau. [URL-29] Falsch-positive *E. coli* bauen das auf dem Nährmedium ausplattierte β -Galaktosidase-Substrat X-Gal ab und die entsprechenden Kolonien erscheinen blau. In Plasmiden mit Insert, das heißt ein eingebautes fremdes DNA-Konstrukt innerhalb des Vektors, zerstört das lacZ-Gen (ORF des LacZ α -Peptids). Die Folge ist eine ausbleibende Komplementation und ein Fehlen des X-Gal-Abbaus, sodass die Kolonien farblos bis weiß erscheinen (weißer Phänotyp). [Fuchs, Schlegel &

Eitinger, 2007] IPTG (Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid) ist ein künstlicher Zucker, der als synthetisches Analoga zur Lactose wirkt. Durch die Zugabe von IPTG zum Nährmedium wird der Lac-Repressor inaktiviert und die Synthese von β -Galactosidase induziert. Dieses Enzym spaltet den Milchzucker Laktose (hier künstlich in Form von IPTG). Daher wirkt IPTG als Induktor für das Lac-Operon und damit auch für klonierte Gene, die unter der Kontrolle des Lac-Operons stehen. IPTG wird genutzt zur Induktion der Expression klonierter Gene, die unter der Kontrolle des Lac-Operons stehen. [URL-30]

4.2.5 Plasmid-Mini-Preparationen

Plasmid-DNA ist wesentlich kleiner als chromosomale DNA. Die Plasmidringe liegen in einer superhelikalen Form vor, wodurch sich die DNA leicht abtrennen lässt und mit einem gewissen Maß an Reinheit nach der Aufreinigung vorliegt. Um rekombinante Klone zu analysieren, wird die Plasmid-DNA aus Bakterienzellen gewonnen. Es existieren verschiedene Verfahren der Plasmid-Aufreinigung, wobei die am weitesten verbreiteten Methoden die alkalische Lyse nach Birnboim und die Plasmidisolierung an einer DNA-bindenden Matrix mittels Nukleobond-Säulchen (siehe Kapitel „Plasmid-Mini-Kit“) darstellen. [Birnboim, 1983; Birnboim, H. C. and J. Doly, 1979; Eds. Ausubel, F. M. et al.; Ausubel, 2002]

4.2.5.1 modifiziert nach Birnboim, H.C. (Birnboim 1983)

Das der klassischen Plasmid-Aufreinigung nach Birnboim zugrunde liegende Verfahren ist die „Alkalische Lyse“. Durch eine alkalische Proteinase-K-Behandlung wird die Zelle lysiert. In der Lösung vorliegende intrazelluläre Proteine werden durch Erhöhung der Salzkonzentration und Zusatz von SDS ausgefällt. Dabei wird ausgenutzt, dass chromosomale DNA aggregiert und ausfällt, aber die Plasmid-DNA nach dem Ausfallen wieder renaturiert und in Lösung geht. Unlösliche Produkte werden durch Zentrifugation abgetrennt und niedermolekulare RNA durch RNase-A-Behandlung abgebaut.

Die verwendeten Bakterien werden in einer Übernacht-Kultur angezüchtet und haben für die folgende Plasmid-Aufreinigung die stationäre Wachstumsphase erreicht. Die Bakterien werden zentrifugiert und das Pellet in einer Glucose-Tris-EDTA-Pufferlösung (GTE- Lösung) resuspendiert. Für die Lyse der Zellwand wird das Enzym Lysozym zur Lösung zugegeben. Der Proteinase-K-Verdau unterstützt die Zelllyse. Die bakterielle Zellwand öffnet sich an diskreten Stellen und mithilfe einer NaOH/SDS-Lösung wird die Zellwand aufgebrochen, wodurch die Zellinhaltsstoffe austreten können. Natriumhydroxid und das Detergenz Sodiumdodecylsulfat (SDS) bewirken eine alkalische Verseifung der Lipide und die Lyse der Zellen.

Die Zugabe von 5 M Kaliumacetat oder 3 M Natriumacetat bewirkt eine Neutralisation des Natriumhydroxids sowie die Komplexbildung von chromosomaler DNA und Proteinen mit SDS und Kalium- bzw. Natriumionen. Das heißt Proteine und chromosomale DNA fallen aus. Diese Komplexe bleiben größtenteils an den Zelltrümmern gebunden, wohingegen Plasmid-Ringe wieder in Lösung gehen. Nach der Zentrifugation befinden sich ausschließlich Plasmid-DNA, RNA und Spuren chromosomaler DNA-Bruchstücke im Überstand. Die Plasmid-DNA wird mithilfe von 96 %-igem Ethanol bei -20°C gefällt. Das Prinzip dieser Fällung basiert auf einem Entzug der Hydrathülle. Die Lösung wird zentrifugiert und das entstandene DNA-Pellet mithilfe von 70%-igem Ethanol gewaschen. Die DNA-Lösung wird erneut zentrifugiert und nach der Pelletierung der Plasmid-DNA der Überstand verworfen. Das Pellet wird getrocknet und in einem TRIS/EDTA-Puffer (pH 7,5) mit RNaseA-Zusatz (10 mg/ml) gelöst. [Birnboim, 1983; Birnboim, H. C. and J. Doly, 1979]

4.2.5.2 Plasmid-Mini-Kit

Die Aufreinigung der Plasmid-DNA aus den *E. coli*-Bakterien erfolgt mithilfe des „Plasmid DNA purification“-Kits der Firma Macherey-Nagel. Das Miniprep-Verfahren beruht auf Nukleobondsäulen, über die der Überstand gegeben wird. Die DNA-bindende Matrix bindet die Plasmid-DNA. Nach mehreren Waschschritten wird die Plasmid-DNA eluiert. [Ausubel, 2002]

Kultivierung und Ernte der *Escherichia coli*-Bakterien (K12 JM 101)

Die transformierten *Escherichia coli*-Bakterien werden als Flüssigkultur vermehrt. Wenn die Lösung trüb erscheint, sind ausreichend viele Bakterien in dem Medium gewachsen.

Aus den Übernachtskulturen der *E. coli*-Bakterien werden 2 mL in ein Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert. Der Überstand sollte idealerweise klar erscheinen und wird dekantiert.

Zellyse

RNase A (lyophilisiert) wird in Resuspensionspuffer (Buffer A1) gelöst und gevortext. Die Lösung wird zu dem Pellet gegeben und dieses durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Durch Zugabe des Lysepuffers und vorsichtiges Invertieren werden die Zellen lysiert und der Zellinhalt kann austreten (Inkubationszeit von 5 min). Danach wird Neutralisationspuffer (Buffer A3) hinzugefügt um die Puffer-Bestandteile zu neutralisieren.

Reinigung des Lysats

Das Lysat wird von Nicht-DNA-Bestandteilen (Zellbestandteile) gereinigt. Die Lösung wird zentrifugiert und die DNA befindet sich in dem klaren Überstand, da sie zu leicht ist um pelletiert zu werden.

Binden der DNA

Für die weiteren Arbeitsschritte wird mit einer DNA-Säule gearbeitet. Der Überstand des letzten Zentrifugationsschrittes wird aufgenommen und auf die Säule pipettiert. Die in der Lösung enthaltene DNA bindet an die Matrix der Säule. Durch Zentrifugieren bei 11.000 x g für 1 min werden die übrigen nicht-genomischen Bestandteile aus der Lösung entfernt und sammeln sich im Durchfluss an, welcher verworfen wird.

Waschen der Silika-Membran

Die DNA, welche auf der Säule gebunden vorliegt, wird mit vorgewärmtem Waschpuffer (Buffer AW) gewaschen und zentrifugiert. Anschließend wird eine weitere Waschlösung, versetzt mit 96%-igem Ethanol, auf die Membran gegeben, zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Die Silika-Membran wird trocken zentrifugiert um die letzten Flüssigkeitsanteile (Ethanol) aus der DNA zu entfernen.

Elution der DNA

Die DNA liegt aufgereinigt vor und wird von der Membran herunter gewaschen (Elution) um sie in Lösung zu bringen. Es werden 5 µL vorgewärmter Elutionspuffers (Buffer AE) auf die Säule pipettiert und für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert (Erhöhung der Plasmid-Ausbeute). Es folgt eine Zentrifugation, aber es wird eine niedrigere Geschwindigkeit empfohlen als im Protokoll des Kits steht, um ein Abbrechen der Reaktionsgefäß-Deckel zu vermeiden.

Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration in den vorliegenden isolierten und aufgereinigten DNA-Lösungen wird mittels NanoDrop vermessen. Um das Gerät zu initialisieren wird 1 µl H₂O auf das Gerät pipettiert. Der Referenzwert (Blank-Wert) für die folgende Messung der DNA-Lösungen wird durch die Vermessung von 1 µl AE-Puffer (Elutionspuffer) erhalten. Für die Bestimmung der DNA-Konzentration wird 1 µl der DNA-Lösung auf das Gerät pipettiert.

4.2.6 Kulturtechniken von *Escherichia coli*

Escherichia coli wird im Labor allgemein für die Transformation mit Plasmiden und deren Klonierung ausgenutzt. In dieser Arbeit wird der *E. coli*-Stamm K12 JM101 verwendet. Ein Überblick über die in der Arbeit angewendeten Techniken ist in Tabelle 10 dargestellt.

Plattenkulturen

Die gegossenen Antibiotika-(Ampicillin)platten (LB-Medium + Ampicillin) werden im Brutraum bei 37 °C kurz erwärmt. Auf den LB-Medien werden jeweils 40 µl XGal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranosid) und 40 µl IPTG (Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid) ausplattiert, bis die Lösungen in das Medium eingezogen sind. Danach werden die Platten bis zur Verwendung im Brutraum gelagert. Die beiden Zusätze XGal (chromogenes Substrat der β -Galaktosidase) und IPTG werden für die Blau-Weiß-Selektion genutzt. Bei Vorhandensein eines intakten β -Galaktosidase-Gens (kein Insert vorhanden) entsteht ein intensiv blaues Präzipitat auf dem LB-Medium und es ist möglich zwischen Kolonien zu differenzieren, die Plasmide mit und ohne Insert enthalten.

Flüssigkulturen

Nachdem die Kolonien auf den Platten gewachsen sind, werden je zwei weiße Kolonien von den Proben mithilfe eines Zahnstochers gepickt und einzeln in LB-Medium (versetzt mit Ampicillin) kultiviert. Es werden diejenigen Bakterienkolonien gepickt, die am besten auf den Platten gewachsen sind. Die weißen Kolonien stammen von Bakterien, welche das Plasmid mit einem Insert tragen. Das Medium für die Kultivierung der *E. coli*-Bakterien wird vorbereitet, indem das Antibiotikum Ampicillin in LB-Medium 1:1000 verdünnt wird. Dafür wird das entsprechende Volumen LB-Medium mit Ampicillin (Lagerung bei -20 °C im Tiefkühlschrank) versetzt und die Lösung zu je 5 mL auf neue Falkons aufgeteilt. Das verwendete LB-Medium muss klar sein, da man ansonsten mit Kontaminationen rechnen muss. Jede gepickte Kolonie wird in ein Falcon mit LB-Medium und Ampicillin eingebracht. Die angelegten Flüssigkulturen werden über Nacht im Brutraum bei 37 °C inkubiert, dabei bleiben die Falkons leicht geöffnet und werden in einem Schüttler geschwenkt um eine optimale Belüftung und die Aufnahme von Sauerstoff durch die Bakterien zu garantieren.

Um aus einer bestehenden Flüssigkultur eine neue Flüssigkultur anzusetzen, wird das mit Ampicillin vorbereitete LB-Medium (siehe oben) mit 10 µL Bakterien-Stocklösung angeimpft. Es wird von der bereits generierten Bakterien-Stocklösung eine neue Übernacht-Kultur

hergestellt. Die Kultur wird über Nacht bei 37 °C in einem Schüttler und mit leicht angedrehtem Deckel zur Belüftung der Kulturen im Brutraum inkubiert. Nach der Inkubation erscheint das Medium, durch die Vermehrung der Bakterien, trüb.

Glycerinkulturen

Um die hergestellten Kulturen über einen langen Zeitraum haltbar zu machen, werden diese in Glycerin eingebracht und bei -80°C eingefroren. Dazu werden in 600 µL 50%-igem Glycerin (+ 50% aqua dest.) 900 µL *E. coli*-Kultur eingebracht und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren ineinander gemischt. Die Lösung aus *E. coli*-Kultur und Glycerin wird in einem Kryoröhrchen bei -80°C eingefroren.

Die Tabelle 10 gibt einen Überblick über die in dieser Arbeit angewendeten Kultivierungstechniken des *E. coli*-Bakteriums.

Tabelle 10 Kulturtechniken *Escherichia coli*

| Kultur | Herstellung | Verwendung |
|---|---|---|
| Plattenkultur | Ausstreichen einer Zellsuspension auf LB-Agar-Platten und Inkubation bei 37°C | Vereinzellung, Selektion |
| Flüssigkultur (Übernacht-Kultur) | steriles Animpfen von 5ml LB-Medium mit Einzelkolonien aus Plattenkultur oder mit Glycerinkulturen; Schütteln bei 37°C für 15h | zur Plasmid-Gewinnung im analytischen Maßstab, als Vorkultur für Großkulturen |
| Glycerinkultur | Versetzen eines Aliquot einer Flüssigkultur mit 50% Glycerin im Verhältnis 3:2, sorgfältiges mischen und sofortige Lagerung bei -80°C | längerfristige Aufbewahrung von <i>E. coli</i> -Stock-Kulturen |

4.3 Arbeiten mit DNA

4.3.1 DNA-Isolation und DNA-Aufreinigung

Der Vervielfältigung von gewünschten DNA-Fragmenten (PCR) geht die Isolierung der DNA aus Zellen (Ausgangsmaterial) voraus. Dafür wird das Zellmaterial abzentrifugiert, die Zellstrukturen aufgelöst und die DNA von anderen Zellbestandteilen abgetrennt. Außerdem werden neben der Auflösung der Zellmembran und -strukturen die Nukleoproteine von der DNA abgelöst. Durch Phasentrennung zwischen organischer und wässriger Phase können Proteine und andere Zellbestandteile abgetrennt werden. Die DNA aus der wässrigen Phase wird mit Ethanol gefällt, da der Alkohol der DNA die Hydrathülle entzieht. Die reine DNA wird in einem salzarmen Puffer wieder resuspendiert. Die isolierte DNA wird mittels Photometrie bei 260 nm quantifiziert.

4.3.1.1 Phenol-/Chloroform-/Isoamylalkohol-Aufreinigung und Ethanol-Fällung (PCI)

Grundlagen der PCI-Methode

Die Phenol-Chloroform/Isoamylalkohol-Methode (PCI-Methode) beruht auf der Verwendung organischer Chemikalien zur Aufreinigung von DNA. Diese wird durch die Anwendung eines Gemisches aus Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol von Proteinen und Lipiden gereinigt. [URL-31] Außerdem werden Enzyme im Zell-Lysat inaktiviert. [URL-32] Das Verfahren beruht auf der Grundlage der Phasentrennung eines heterogenen Gemisches mittels Zugabe der organischen Lösungsmittel Phenol und Chloroform. [URL-31] Dazu wird die DNA-Lösung mit einem Phenol/Chloroform-Gemisch versetzt und durch Vortexen des Gemisches eine weiße Mischphase (Emulsion) erzeugt. Wässrige und organische Bestandteile trennen sich durch anschließende Zentrifugation in unterschiedliche Phasen auf und die Proteine sammeln sich in der Interphase. [URL-33]

Die Abbildung 15 zeigt die Schichtung der Mischphase aus DNA-Lösung und Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol nach dem Zentrifugationsschritt.

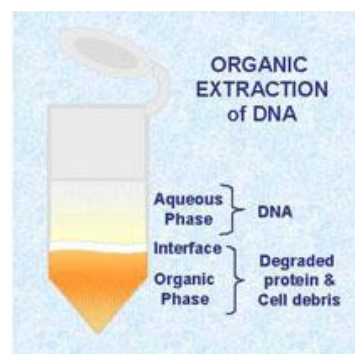


Abbildung 15 organische Extraktion von DNA: Phasentrennung [URL-31]

Es lässt sich nach der Zentrifugation des Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches und der DNA-Lösung die Entstehung von drei Phasen (Phasentrennung) erkennen. [URL-31] Zur Erhöhung der Reinheit wird dieser Arbeitsschritt solange wiederholt, bis die Bildung einer Interphase zwischen wässriger und organischer Phase ausbleibt und sich damit keine Proteine mehr in der Lösung befinden. [URL-32] Die Proteine werden aus der wässrigen DNA-Lösung durch einfache Extraktion mittels des organischen Lösemittels Phenol (Proteinlösungsmittel) entfernt. Phenol ist mit Wasser nicht mischbar und muss für die Isolation von DNA einen pH-Wert von 7,5 – 8,0 aufweisen. [Kirby KS, 1956; Brawerman et al., 1972; Graßmann & Deffner, 1953] [URL-31]

Das verwendete Phenol ist Tris/HCl- oder TE-gesättigt (pH 8,0) und darf nicht zu alt sein, da es sonst oxidiert vorliegt und die DNA schädigt. [Kück, 2005a] Proteine werden durch die Anwendung von Phenol denaturiert. [URL-33]

Chloroform (CHCl_3) ist wenig wasserlöslich und mit organischen Lösungsmitteln wie Phenol mischbar. Die Chemikalie weist eine höhere Dichte als Wasser oder Puffer, in denen DNA gelöst vorliegt, auf. Gegenüber Phenol hat Chloroform eine niedrigere Dichte. Durch Chloroform-Extraktion werden Phenol-Bestandteile und lipophile Stoffe, welche die DNA verunreinigen, aus der Lösung gezogen. Die Lipide lösen sich in der Chloroform-Lösung.

Die Verwendung von zwei unterschiedlichen organischen Lösemitteln (Phenol und Chloroform) bedingt eine effizientere Deproteinierung, das heißt eine verbesserte Aufreinigung.

Die nach der Zentrifugation des Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-DNA-Gemisches entstandene Phasentrennung ist wie folgt definiert: die obere wässrige Phase (polar) enthält die Nukleinsäure (doppelsträngige DNA), welche einfach von der organischen Zwischenphase (Proteine) und der unteren unpolaren organischen Phase (Phenol) abgetrennt werden kann.

[Kirby KS, 1956; Graßmann & Deffner, 1953; Brawerman et al., 1972] [URL-31]

Die durch Phenol denaturierten Proteine lagern sich in der Zwischenphase (organische Interphase) an. [URL-31] An dieser Grenzschicht zwischen wässriger und organischer Phase befindet sich eine mehr oder weniger deutliche, helle Proteinschicht. Phenol, welches durch seine gegenüber Wasser höheren Dichte die untere Phase bildet, unterdrückt das Abwandern der DNA in die organische Phase. [Kirby KS, 1956; Graßmann & Deffner, 1953; Brawerman et al., 1972] In der Phenol-Phase (untere Phase) reichern sich lipophile Stoffe an. [URL-31]

Liegen hohe Konzentrationen an gelösten Stoffen ($>0,5 \text{ M}$ Salz) vor, ist es möglich, dass Phenol- und wässrige Phase invertieren oder sich schwer trennen lassen. Mittels Zugabe von Chloroform (im Verhältnis 1:1 zu Phenol) ist eine klare Phasentrennung möglich. Die Dichte der Phenol-Phase wird durch Chloroform erhöht und bewirkt eine scharfe Phasengrenze zwischen organischer Phase (Phenol-Chloroform) und wässriger Phase (niedrigere Dichte gegenüber Phenol-Chloroform). [Kirby KS, 1956; Graßmann & Deffner, 1953; Brawerman et al., 1972] [URL-31] Durch die Zugabe von Isoamylalkohol wird die Schaumbildung der organischen Phase während des Aufreinigungsprozesses verhindert. [Kirby KS, 1956; Graßmann & Deffner, 1953; Brawerman et al., 1972]

Die PCI-Aufreinigung ist nicht in der Lage aus einer DNA-Lösung Salze zu entfernen. Nach der Anwendung des Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches erfolgt die Salz Entfernung durch Waschen mit 70%-igem Ethanol. [URL-32] DNA wird aus der wässrigen Phase durch Präzipitation (Fällung) mit Ethanol zurückgewonnen. [Kirby KS, 1956; Graßmann & Deffner, 1953; Brawerman et al., 1972]

Die Nukleinsäure wird bei niedriger Temperatur in der Anwesenheit einwertiger Ionen mittels Natriumacetat ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$) und bei ausreichender Ethanolkonzentration gefällt. [Kück, 2005]

Aufreinigung der generierten Kontroll-Plasmide (Anwendung der PCI-Methode)

Die aufzureinigende Plasmid-DNA (hier: 50 µL) wird in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß gegeben und mit aqua dest. auf 400 µL aufgefüllt. Zu dieser Lösung wird der gleiche Anteil eines Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches gegeben. Das Gemisch aus Phenol-Chloroform und Isoamylalkohol muss unter dem Abzug pipettiert werden und die benutzten Pipettenspitzen in entsprechend gekennzeichneten Behältern verworfen und entsorgt werden. Die Lösung wird 30 sec. gevortext bis sich eine Emulsion bildet und eine optimale Durchmischung der verschiedenen Bestandteile vorliegt. Es folgt die Zentrifugation für 10 min bei maximaler Geschwindigkeit (13.500 rpm) und Raumtemperatur. Im Reaktionsgefäß bilden sich drei Phasen aus, wobei die unterste Phase die organische Phase aus Phenol-Chloroform darstellt, die darüberliegende Phase beinhaltet Proteine und die oberste Phase enthält die Plasmid-DNA. Die oberste DNA-Phase (~ 350 µL) wird mittels einer Pipette abgezogen und in ein neues 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt. Beim Abpipettieren der Phase muss darauf geachtet werden, dass die darunter liegende Phasengrenze nicht zusammenbricht und es zu einer Kontamination der Plasmid-DNA mit Proteinen kommt. Falls die Phasengrenze zerstört wird, muss das Gemisch erneut zentrifugiert werden. Der restliche Inhalt des Reaktionsgefäßes (Proteine und Phenol-Chloroform) muss in entsprechend gekennzeichneten Behältern entsorgt werden. Es werden 35 µL 5 M Natriumacetat (NaAc) zur DNA-Lösung pipettiert und im Anschluss 800 µL 96%-iger Ethanol (Lagerung bei -20 °C im Kühlschrank) zugegeben. Der vorbereitete Ansatz wird über Nacht in einem -80°C-Tiefkühlschrank platziert.

Nach der Inkubationszeit wird bei 4°C und maximaler Geschwindigkeit (13.500 rpm) für 20 min zentrifugiert. Das entstandene DNA-Pellet muss makroskopisch nicht sichtbar sein, daher wird empfohlen den Überstand an der zum Pellet entgegengesetzten Gefäß-Seite zu entnehmen. Es ist nicht erforderlich die gesamte Flüssigkeitsmenge abzapfen, um das DNA-Pellet nicht zu zerstören.

Das Pellet wird mit 0,5 mL 70 %-igem Ethanol gewaschen (Lagerung im Kühlschrank bei -20°C) und für 10 min bei 4 °C und maximaler Geschwindigkeit (13.500 rpm) zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen, wobei ≤ 10 µL im Reaktionsgefäß verbleiben können. Das Pellet wird für 1 h bei Raumtemperatur getrocknet. Der 30 %-ige Wasseranteil des 70 %-igen Ethanols vermeidet ein schnelles und komplettes Austrocknen des Plasmid-DNA-Pellets.

Nach der Trocknungsphase werden 20 µL 10 mM TRIS zugegeben und die DNA gelöst. Die Tris-Lösung wird für 5 bis 10 min inkubiert. Im Anschluss daran wird die aufgereinigte DNA gevortext und kurz herunterzentrifugiert.

Die Vermessung der Plasmid-DNA und die Bestimmung der Reinheit erfolgt mit dem NanoDrop. Dafür wird das Gerät durch Aufpipettieren von 1 μL H_2O initialisiert und der Referenzwert (Blank-Wert) mit 1 μL 10 mM Tris-Lösung bestimmt. Die DNA-Konzentration der gereinigten Plasmid-Lösung wird in einer Flüssigkeitssäule aus 1 μL DNA-Lösung gemessen.

Um die Daten aus der Bestimmung der DNA-Konzentration zu überprüfen werden die Proben in einem 1 %-igen Gel aufgetrennt. Dafür werden 4 μL aufgereinigte Plasmid-DNA in 16 μL aqua dest. verdünnt und 5 μL Ladepuffer (mit 50%-igem Glycerin verdünnt) hinzugegeben. Als DNA-Leiter wird der Standard „Gene Ruler 1 kb Plus“ mitgeführt. Nach dem Auftrag der Ansätze (20 μL) und des Standards läuft die Gelelektrophorese für 30 min bei 80 V, bis eine ausreichende Auftrennung der DNA unter UV-Licht zu erkennen ist.

Das Gel wird unter UV-Licht eines Transilluminators ausgewertet und fotografiert.

4.3.1.2 Plasmid-DNA Aufreinigung aus Reaktionen

Für die Plasmidaufreinigung des transformierten Plasmids, beispielsweise aus Restriktionsansätzen, wird das „innuPREP DOUBLEpure“-Kit der Firma Analytik Jena – bio solutions genutzt. Dabei wird nach dem Handbuch, welches dem Kit beiliegt, vorgegangen. Die Aufreinigung erfolgt nach dem Standard-Protocol „Purification and concentration of PCR-products from PCR reactions up to 50 μL “.

Der aufzureinigenden DNA-Lösung wird Bindepuffer (Binding Buffer) zugegeben, um die Bindung der DNA an die Membran der DNA-Säule (Spin-Filter) zu optimieren und den Prozess der DNA-Aufreinigung zu begünstigen. Der Bindepuffer wird zuerst pipettiert und die Plasmid-DNA durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren in dem Puffer verteilt. Dabei ist darauf zu achten, dass die Filtermembran auf dem Boden der DNA-Säule nicht durch die Pipettenspitze zerstört wird. Die Lösung wird zentrifugiert und das Zentrifugat verworfen. Dabei muss darauf geachtet werden, dass die DNA-Säule, welche die Plasmid-DNA gebunden hat, in keinerlei Kontakt mit dem Durchfluss kommt. Der Durchfluss enthält Puffer- und Substratrückstände sowie Enzyme aus dem Restriktionsverdau. Die DNA wird mithilfe von 50 μL Elutionspuffer (vorgewärmt auf 50 $^{\circ}\text{C}$) von der Membran des Spin-Filters heruntergewaschen (eluiert). Der Elutionspuffer muss 5 min bei Raumtemperatur auf der Säulenmatrix inkubieren damit sich die DNA optimal von der Membran lösen kann. Durch Zentrifugation gelangt der Elutionspuffer mit der aufgereinigten Plasmid-DNA in das Reaktionsgefäß (Elutions-Tube).

4.3.1.3 Gelextraktion von DNA-Fragmenten

Das GOI (Abschnitt des FoxP3-Gens) wird in einer PCR amplifiziert und mittels Gelelektrophorese überprüft. Nach Auftrennen der DNA im Agarosegel, kann das PCR-Produkt aus den Gelbanden mittels des innuPREP DOUBLEpure Kits (Analytik Jena) aufgereinigt werden. Die Reinigung der DNA erfolgt nach dem Standardprotokoll für die DNA-Extraktion aus Agarose-Gelstücken (TAE oder TBE-Agarose-Gel) – Standard Protocol: DNA extraction from agarose gel slices (TAE or TBE agarose gels), welches dem Kit beiliegt (siehe Abbildung 16).

Die Aufreinigung der PCR-Produkte aus dem Agarosegel wird anhand der Angaben aus Abbildung 16 realisiert.

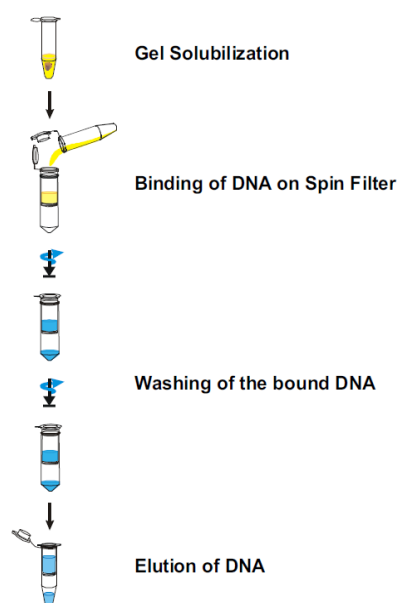


Abbildung 16 Arbeitsschritte: Aufreinigung von PCR-Produkten aus Gelbanden

Das Gel wird auf einem UV-Tisch platziert und die Bande mit dem gesuchten DNA-Fragment herausgeschnitten. Dabei muss darauf geachtet werden, dass der Anteil an herausgeschnittenem Gel um die Bande herum minimal ist, um die DNA-Ausbeute nicht zu senken. Im Gel sind in den 20 µl eingesetztem PCR-Produkt schätzungsweise 300 ng DNA enthalten, das heißt die DNA-Konzentration beträgt 15 ng/µl. Diese Abschätzung erfolgt anhand der Fluoreszenz-Intensität der Bande. Das Gewicht der Gelbande wird überprüft, da nicht mehr als 300 mg Material pro Spin Filter (Säule) in das Protokoll eingesetzt werden dürfen. Das Gelstück wird in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und Gel-Solubilizer-Lösung zugegeben. Während einer Inkubationszeit von 10 min bei 50°C im Thermomixer wird das Gel vollständig gelöst. Die Zugabe von Binding-Optimizer-Lösung bewirkt, dass die DNA in der Probe im nachfolgenden Schritt optimal an die Säule bindet. Die Suspension wird mehrmals auf- und abpipettiert und gevortext. Die Probe wird auf den Spin-Filter gegeben und

zentrifugiert. Das Filtrat im Receiver-Reaktionsgefäß wird verworfen. Die DNA (gebunden auf der Säule) wird mithilfe einer Waschlösung und anschließender Zentrifugation gewaschen. Durch eine sich anschließende Trocken-Zentrifugation werden Ethanol-Spuren (Waschlösung enthält Ethanol) aus der DNA beseitigt. Das Zentrifugat, welches sich im Receiver-Reaktionsgefäß befindet, wird verworfen. Der Spin-Filter wird in ein 1,5 ml-Elutions-Reaktionsgefäß gesetzt, 50 µL vorgewärmter Elutionspuffer auf die Säule gegeben und dieser auf der Matrix der Säule bei Raumtemperatur für 1 min inkubiert. Dadurch wird die DNA, welche auf dem Filter der Säule gebunden vorliegt, optimal eluiert. Nach der Zentrifugation liegt die DNA aufgereinigt vor. Die extrahierte und aufgereinigte DNA kann über einen kurzen Zeitraum bei + 4°C im Kühlschrank gelagert und für längere Lagerungsperioden im Tiefkühlschrank bei -20°C aufbewahrt werden. Die DNA-Konzentration wird mittels NanoDrop bestimmt.

Da bei der Aufreinigung DNA verloren gegangen ist, sind in der aufgereinigten Probe von vorher 15 ng/µl DNA noch 10 ng/µl DNA enthalten.

4.3.2 Agarose-Gelelektrophorese

Um die DNA ihrer Größe nach aufzutrennen wird eine Gelelektrophorese durchgeführt. Dabei wird die elektrophoretische Trennung über ein Gel-Polymer realisiert, welches als Trägermedium fungiert. [URL-34] Das Gel besteht aus dem linearen Polysaccharid Agarose, welches in Gegenwart eines Puffers geschmolzen wird. Nach dem Erkalten der Gellösung erstarrt diese und wird zu einer Gelmatrix. [URL-35] Im Gelverbund bildet Agarose ein engmaschiges Netz, das für die aufzutrennenden Moleküle eine Behinderung im elektrischen Feld darstellt. Die dem Gel immanenten Poren bewirken eine Separation der DNA-Moleküle nach deren Größe. Die Porengröße bestimmt die Wanderungsgeschwindigkeit der in die Geltaschen eingebrachten DNA-Fragmente. Gele mit einem Agarose-Anteil von 1% besitzen Poren mit einer Größe von 150 nm. Mittels 2%-iger Gele können lineare DNA-Moleküle im Bereich von 0,1 – 2,0 kb getrennt werden (Trennbereich). Umso größer die Agarose-Konzentration ist, desto kleiner werden die Poren und es können kleinere DNA-Fragmente getrennt werden. Das heißt, die Porengröße des Trärgels wird an die Größe der zu trennenden DNA adaptiert. [URL-34] [URL-35] Je nach der vorliegenden Agarose-Konzentration ist die Größe der Gelporen variabel. [URL-34] Die negative elektrische Nettoladung der DNA, die unabhängig ist vom pH-Wert des Mediums, bewirkt im elektrischen Feld eine Wanderung zur Anode. Die negative Ladung der DNA resultiert aus der Negativität der Phosphatreste und macht die DNA zum Polyanion. Das Verhältnis von Ladung und Masse ist bei DNA-Molekülen

gleich, wodurch Wanderungsgeschwindigkeiten von Länge und Konformität der DNA beeinflusst werden. Die elektrophoretische Trennung erfolgt nach Unterschieden in Molekülgröße und Molekülform. Die Wanderungsgeschwindigkeit und die Wanderungsstrecke verhalten sich umgekehrt proportional zum Logarithmus der Basenpaarzahl. Für den Trenneffekt von untergeordneter Bedeutung sind Temperatur und Basenzusammensetzung der DNA. [URL-34] [URL-35] [Rassow, 2006] DNA-Fragmente, die kurz sind wandern schneller im Gel als längere Moleküle, was bedeutet, dass sich die kürzesten Stränge am weitesten in Richtung Anode bewegen. Supercoiled-DNA bewegt sich schneller durch das Gel als lineare oder zirkuläre DNA. [URL-34] Die Geschwindigkeit, mit der die DNA das Gel passiert, hängt von der angelegten Spannung ab, die zwischen ungefähr 80 V/Gel und 100 V/Gel – es muss mit 5 V/cm Laufweg gerechnet werden. [URL-35] Um die Größe der im Gel gewanderten DNA abschätzen zu können, läuft neben den eigentlichen Proben ein Marker (Standard) mit, der DNA-Moleküle mit einer bekannten Größe enthält. [Rassow, 2006] [URL-34]

Die Gelgrundlage für die durchgeführte Gelelektrophorese bildet Agarose-Pulver, das in TBE-Puffer durch Aufkochen gelöst wird. Für 150 ml eines 1%-igen Gels werden 1,5 g Agarose-Pulver in 150 ml TBE-Puffer gelöst und für ein 2%-iges Gel werden 3 g Agarose in 150 ml TBE-Puffer gelöst. Um die DNA nach der elektrophoretischen Auftrennung im Gel sichtbar zu machen, wird der Gellösung nach dem Lösen des Agarose-Pulvers der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid zugegeben. Dabei muss darauf geachtet werden, dass die Gellösung nicht zu heiß ist, wenn der Farbstoff zugegeben wird, da dieser bei großer Hitze zerstört wird. Auf 100 ml Lösung werden 5 µl Ethidiumbromid gegeben. Der Farbstoff besitzt die Fähigkeit in die Basen der DNA zu interkalieren und wird unter UV-Licht durch eine orangerote Fluoreszenz sichtbar gemacht. Nach dem Gießen der vorbereiteten Gel-Lösung wird ein Kamm eingebracht, welcher die Slots (Geltaschen) für die Proben ausformt. Das erkaltete Gel wird in der Elektrophoresekammer auf einem Schlitten platziert und die Kammer mit TBE-Puffer aufgefüllt. Es wird so viel Puffer zugegeben bis das Agrosegel vollständig bedeckt ist (bis zur maximalen Füllhöhe der Kammer). Nach dem Auftragen der Proben und 6 µl der DNA-Leiter (Standard) in die Slots, wird eine Spannung zwischen 80 V und 100 V angelegt, was sich nach der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente richtet.

4.3.3 Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung der DNA

Die Konzentration der DNA-Proben wird neben der visuellen Abschätzung aus dem Agarosegel mittels einer photometrischen Bestimmung realisiert. Bei dieser Methode wird die

Lichtabsorption der DNA bei einer Wellenlänge von $\lambda=260$ nm ausgenutzt und die optische Dichte (OD) der DNA-Lösung bei dieser Wellenlänge gemessen.

Ein Wert von $A_{260} = 1$ entspricht einer Konzentration an dsDNA von $c = 50 \text{ ng}/\mu\text{l}$. Demnach berechnet sich die DNA-Konzentration einer Lösung unter Berücksichtigung einer etwaigen Verdünnung V nach:

$$c [\text{ng}/\mu\text{l}] = A_{260} \times 50 \times V$$

Außerdem werden mit dem Spektrophotometer mögliche Verunreinigungen der DNA bestimmt. Dazu wird die optische Dichte bei 280 nm und 230 nm bestimmt. Der Quotient aus den beiden Absorptionen bei 260 nm und 280 nm (A_{260}/A_{280}) gibt die Reinheit der DNA bezüglich enthaltener Proteine an. Kontaminierende Proteine absorbieren das Licht bei 280 nm. [Hallbach, 2006] Der Quotient A_{260}/A_{280} liegt bei einer sauberen DNA-Lösung bei 1,8-2,0.

Spuren von Ethanol und Salzen werden mittels des Absorptionsquotienten bei 260 nm und 230 nm (A_{260}/A_{230}) angegeben. Das Gerät mit dem die DNA-Konzentration und die Reinheit der DNA bestimmt werden ist der NanoDrop ND-1000 der Firma PEQLAB GmbH. Die Initialisierung des Geräts erfolgt mithilfe von $1 \mu\text{l H}_2\text{O}$. Der Blank-Wert (Referenzwert) wird mithilfe der Lösung generiert, in dem die DNA jeweils gelöst vorliegt. Das Gerät bestimmt durch einen Lichtstrahl die Absorption, die durch die Flüssigkeit zustande kommt. Aus der Absorption berechnet das Gerät DNA-Konzentration und DNA-Reinheit.

4.3.4 Vervielfältigung von DNA – Polymerasekettenreaktion (PCR)

4.3.4.1 Standard-PCR nach Kary Mullis

Prinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR)

In biologischen Proben liegen meist geringe DNA-Mengen vor, die für experimentelle Analysen unzureichend sind. Daher muss die DNA vervielfältigt werden, um sie molekularbiologischen und mikrobiologischen Methoden – für Nachweis, Untersuchung und Weiterverwendung zugänglich zu machen. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR = Polymerase Chain Reaction) bietet dafür das optimale Werkzeug. Mittels PCR werden die DNA-Mengen exponentiell vermehrt (amplifiziert). Die Amplifikation beruht auf der Grundlage einer zyklischen Wiederholung der Replikation eines DNA-Fragments. Die Grenzen des Fragments werden durch die Zugabe von Starter-Oligonukleotiden (Primern) bestimmt. [Müller & Wagener, 2009] Für die Amplifikation der DNA muss eine Reaktionslösung generiert werden, die aus den zu amplifizierenden DNA-Molekülen (Template-DNA, Matrize), der Polymerase (Enzym), den Primern (Starter-Oligonukleotide) und Nukleotiden (Adenin, Thymin, Guanin, Cytosin) besteht. Die PCR läuft als immer wiederkehrende Zyklen ab, wobei ein Zyklus aus drei Schritten

aufgebaut ist. Bei der Denaturierung wird die Reaktionslösung auf 95°C erhitzt und die beiden komplementären DNA-Stränge trennen sich auf (Denaturierung der DNA). Der folgende Annealing-Schritt wird bei einer Primer-spezifischen Temperatur von z. B. 55°C durchgeführt und ermöglicht die spezifische Bindung des Primerpaares an die DNA, zu der diese sich komplementär verhalten (Hybridisierung). Dieser kurze doppelsträngige Abschnitt der DNA dient dem Polymerase-Enzym als Startsequenz um den folgenden Einzelstrang mit Nukleotiden zu vervollständigen (Verbinden der einzelnen Bausteine der DNA zu langen Molekülsträngen) und so die DNA doppelsträngig zu verlängern. Durch Erhöhen der Temperatur auf 72°C verlängert die Polymerase den DNA-Strang (Elongation). [URL-36] [Mullis & Faloona, (1987b); Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R, 1992; Reidhaar-Olson JF, Hammer J, April 2011; Mullis KB, December 8, 1993]

Um die Effizienz der PCR zu erhöhen, werden dem PCR-Mix bestimmte Substanzen zugesetzt, welche die Bedingungen verbessern. Dimethylsulfoxid (DMSO) fördert die PCR und erhöht die Ausbeute an PCR-Produkten. Die Substanz gilt als PCR-Enhancer. Magnesiumchlorid (MgCl_2) neutralisiert das bei der Kettenverlängerung während der PCR entstehende Pyrophosphat (Diphosphat). Durch die Reaktion der freien OH^- -Gruppe des endständigen Zuckermoleküls mit der Phosphatgruppe eines freien Desoxyribonukleosidtriphosphats (dNTP) wird Pyrophosphat abgespalten (Hydrolyse). Entstehendes Pyrophosphat wird durch zweiwertige Magnesium-Ionen (Mg^{2+}) des MgCl_2 gebunden. Außerdem wird durch MgCl_2 die Primerbindung an die Target-DNA verbessert. Durch die negative Ladung des DNA-Rückgrats stoßen sich die beiden Einzelstränge ab, was durch zweiwertige Mg^{2+} -Ionen verringert wird. Die Abstoßungskräfte, zwischen den negativ-geladenen Einzelsträngen, werden abgeschwächt. Mit steigender MgCl_2 -Konzentration steigt die Primerbindung zur Target-DNA sowie die Entstehung unspezifischer PCR-Produkte wie Primer-Dimere.

Das als Reaktionsmedium für den PCR-Ansatz verwendete Wasser muss autoklaviert oder destilliert sein und darf keine DNA oder RNA enthalten.

Durch die Zugabe des Farbstoff Sybr Green zum PCR-Mix, der in doppelsträngige DNA interkaliert, wird während der quantitativen Real-Time PCR und in Schmelzkurven die Mengen an amplifiziertem Target bestimmt. Der Farbstoff Rox dient bei der Bestimmung der Fluoreszenz als Referenzfarbstoff.

Amplifikation des FoxP3-Genabschnitts mittels Standard-PCR

Das Target (CpG-Insel des FoxP3-Gens) wird mittels spezifischer Primer (FoxP3-Forward-Primer und FoxP3-Reverse-Primer) amplifiziert. Die DNA, welche für die Amplifikation genutzt wird, stammt aus Abstrich-Probe, HaCat-Zellen, Hela-Zellen und HPK II-Zellen. Nach Isolierung und Aufreinigung der DNA aus den verschiedenen Zellen, wird diese in die PCR eingesetzt.

Der PCR-Ansatz wird nach den Angaben aus Tabelle 11 zusammenpipettiert und es wird neben weiteren Bestandteilen der PCR-Mix) AmpliTaq Gold™ der Firma Applied Biosystems verwendet. Neben den DNA-Proben wird eine Wasser-Probe als Negativkontrolle in die PCR eingesetzt. Um die Genauigkeit des Experiments zu erhöhen wird der Master-Mix mit einem zusätzlichen Ansatz berechnet und pipettiert. Damit werden Pipettier-ungenauigkeiten kompensiert. Die Lösung aus Forward- und Reverse-Primer muss aus den unverdünnten Stocklösungen generiert werden. Die beiden Primer werden jeweils 1:20 im selben Ansatz verdünnt.

Tabelle 11 Zusammensetzung des PCR-Mix für die Standard-PCR (AmpliTaq Gold-Mix)

| PCR-Bestandteile | 1x Ansatz |
|-------------------------------|------------------|
| Puffer (10x) AmpliTaq Gold™ | 2,5 µl |
| DMSO | 1,25 µl |
| Sybr-Green (10x) | 0 |
| Rox (10x) | 0 |
| dNTP (10 mM) | 0,6 µl |
| MgCl (25 mM) | 0,25 µl |
| Taq-Polymerase | 0,25 µl |
| Primer for+rev (je 5 pmol/µL) | 2 µl |
| H ₂ O | 17,15 µl |
| Reaktionsvolumen | 24 µl |
| DNA-Lösung | 1 µl |
| Gesamtreaktionsvolumen | 25 µl |

Der PCR-Mix-Ansatz wird mit jeweils 24 µl auf die PCR-Reaktionsgefäße aufgeteilt. Es wird jeweils 1 µl der zu amplifizierenden DNA in die Lösungen eingebracht und in ein Gefäß 1 µl Wasser als Kontroll-Ansatz gegeben. Das Reaktionsgemisch wird in einem PCR-Cycler platziert und die Amplifikation nach dem Programm in Tabelle 12 gestartet.

Tabelle 12 PCR-Programm Eppendorf-Cycler (Standard-PCR)

| Amplifikationsprotokoll | |
|--------------------------------|----------------------------|
| 10 min 95 °C | Aktivierung der Polymerase |
| 15 sec 95 °C | Denaturierung |
| 20 sec 58 °C | Annealing |
| 40 sec 72 °C | Elongation |
| ➔ für 35 Zyklen | |
| 5 min 72 °C | Proof-Reading |

Die ersten 10 Minuten bei 95 °C dienen der Aktivierung der Hot-Start-Polymerase. Danach läuft ein Programm von 35 Zyklen ab. Bei jedem Zyklus wird die Template-DNA für 15 Sekunden bei 95 °C denaturiert, das heißt in die beiden komplementären Stränge aufgespalten, für 20 Sekunden hybridisieren die Primer an der einzelsträngigen DNA (Annealing) und für 40 Sekunden verlängern die Polymerasen die DNA-Einzelstränge bei 72 °C (Elongation). Am Ende wird die Temperatur von 72 °C für 5 Minuten gehalten, damit die Polymerase unvollständig synthetisierte PCR-Produkte noch auffüllen kann. Nach dem Beenden des Programms hält das Gerät eine Temperatur von 4 °C bis zum Ausschalten.

Um die gewonnen PCR-Produkte auf ihre Größe zu überprüfen, werden die Proben in eine Gelelektrophorese eingesetzt. Die vervielfältigten DNA-Fragmente werden der Größe nach gegen einen Standard aufgetrennt. Als Vorbereitung wird den PCR-Produkten (25 µl-Ansatz) jeweils 5 µl verdünnter Ladepuffer zugegeben. Dieser bewirkt, dass die Proben in die Geltaschen absinken und mithilfe des im Ladepuffer enthaltenen Farbstoffs ist erkennbar, bis wohin die Proben während der Elektrophorese gelaufen sind. Die vorbereiteten Proben (30 µl) werden vollständig in die Geltaschen eines 1%-igen Gels pipettiert.

Gradienten-PCR

Das Auftreten von Primer-Dimeren während der PCR muss vermieden werden, da die Effizienz der Amplifikation durch ihr Auftreten sinkt. Primer-Dimere entstehen durch gegenseitiges Annealing (Anlagern) kurzer einzelsträngiger Oligonukleotide (Primer) und die Verlängerung der kurzen doppelsträngen-DNA mittels einer DNA-Polymerase. Das spezifische PCR-Produkt wird gestört, weil sich die Menge an vorhandenen Primern und dNTP's verringert und nicht mehr für die Vermehrung des Targets verfügbar ist.

Um die Entstehung von Primer-Dimeren (unspezifisches PCR-Produkt) zu spezifizieren, werden verschiedene Temperaturen während des Annealing-Prozesses (Annealing-Temperatur) mittels einer Gradienten-PCR ausgetestet. Während des Annealings lagern sich die Primer an eine spezielle Target-DNA an, was die Voraussetzung für die Amplifikation durch die Polymerase ist. Unspezifische Produkte stören das spezifische Produkt.

Es werden fünf verschiedene Annealing-Temperaturen an den PCR-Ansätzen getestet und die Menge an entstandenem PCR-Produkt sowie das Vorkommen von Primer-Dimeren bestimmt. Für jeden PCR-Ansatz (methylierungs- und nicht-methylierungsspezifisch) und jede der zu testenden DNA-Proben wird pro Annealing-Temperatur (mit einem Reserveansatz) ein PCR-Ansatz generiert.

Für die Amplifikation wird der AmpliTaq Gold™-Mix verwendet. Die einzelnen Bestandteile des PCR-Master-Mixes werden nach den Angaben aus Tabelle 13 zusammengefügt.

Der Mix für methylierungs- bzw. nicht-methylierungsspezifische Primer wird gemeinsam hergestellt.

Tabelle 13 Zusammensetzung PCR-Mix (Gradienten-PCR)

| PCR-Bestandteile | 1x Ansatz |
|------------------------------------|------------------|
| Puffer (10x) AmpliTaq Gold™-Mix | 2,5 µl |
| DMSO | 1,25 µl |
| Sybr-Green (10x) Farbstoff | 0,5 µL |
| Rox (10x) Referenzfarbstoff | 0,5 µL |
| dNTP (10 mM) | 0,6 µl |
| MgCl (25 mM) | 0,25 µl |
| Taq-Polymerase | 0,25 µl |
| H ₂ O | 16,15 µl |
| Primer Forward+Reverse (5 pmol/µL) | 2 µl |
| Reaktionsvolumen | 24 µL |
| DNA-Lösung (Target) | 1 µl |
| Gesamtreaktionsvolumen | 25 µl |

Dieser Master-Mix wird ohne die Zugabe des Primers vorbereitet und auf zwei neue 0,5-mL-Reaktionsgefäße aufgeteilt. Danach wird die jeweilige Primerlösung für die methylierungsspezifische oder nicht-methylierungsspezifische Amplifikation, bestehend aus Forward- und Reverse-Primern, beigemischt.

Die Zugabe eines spezifischen Forward-Primers und des analogen Reverse-Primers entscheidet über die Amplifikation des methylierten bzw. unmethylierten Targets. Dafür wird die Stocklösung des jeweiligen Forward- und Reverse-Primers mit einer Konzentration von 100 pmol/µL auf eine Arbeitslösung von 5 pmol/µL verdünnt (1:20). Für die Herstellung der Primer-Arbeitslösung werden Forward- und Reverse-Primer ineinander und mit Nuklease-freiem H₂O gemischt.

Der Master-Mix für die einzelnen DNA-Proben wird mit je 24 µL auf die PCR-Reaktionsgefäße aufgeteilt (siehe Tabelle 13 Reaktionsvolumen) und 1 µL der jeweiligen Proben-DNA hinzugefügt. Die Lösungen werden kurz anzenrifugiert um diese zu mischen. Die Ansätze jeder DNA-Probe werden in einer Reihe im PCR-Cycler (Ependorf) angeordnet und an jedes Reaktionsgefäß eine andere Temperatur während des Annealingschrittes angelegt. Für jede DNA-Probe liegen je fünf gleiche Ansätze (pro Annealing-Temperatur ein Ansatz) für die methylierungs- und nicht-methylierungsspezifische PCR vor. Am PCR-Gerät wird der Gradient eingestellt und die Temperaturverteilung auf der Probenplatte simuliert. Dabei wird angegeben in welchen Reihen welche Temperaturen erzeugt werden können. Nach diesem Schema müssen die Probengefäße in dem PCR-Cycler platziert werden.

Die PCR läuft nach den Angaben aus Tabelle 14 an den vorbereiteten Proben ab.

| Tabelle 14 PCR-Programm für die Gradienten-PCR | |
|--|----------------------------|
| Amplifikationsprotokoll | |
| 10 min 95 °C | Aktivierung der Polymerase |
| 15 sec 95 °C | Denaturierung |
| 20 sec verschiedene Temperaturen | Annealing |
| 40 sec 72 °C | Elongation |
| ➔ für 35 Zyklen | |
| 5 min 72 °C | Proof-Reading |

Nach der Amplifikation der PCR-Produkte wird eine Schmelzkurve mit dem Real-Time-Gerät ABI 7300 erstellt. Das genutzte Programm ist in Abbildung 17 dargestellt.

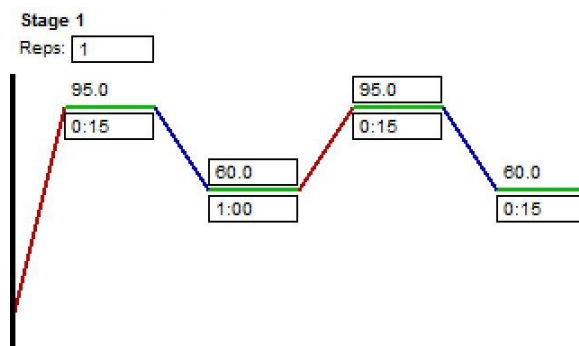


Abbildung 17 Schmelzkurven-Programm für die Gradienten-PCR

Durch Temperaturanstieg von 60°C auf 95°C wird die doppelsträngige DNA in einzelsträngige DNA aufgetrennt. Der während der PCR in die doppelsträngige DNA interkalierte (eingelagerte) Fluoreszenzfarbstoff Sybr Green wird wieder freigesetzt und durch ein optisches System die Abnahme des Fluoreszenzsignals bestimmt. Anhand der Zunahme an freigesetztem Farbstoff und der daraus folgenden Fluoreszenzabnahme berechnet die Software Applied Biosystems Sequence Detection Software Version 1.2 (7300 System SDS software Core Application) die spezifische Schmelztemperatur des PCR-Produktes. Da alle generierten PCR-Produkte anhand der Schmelzkurve detektiert werden, können auch unspezifische Produkte wie Primer-Dimere erkannt werden. Für die Auswertung der Daten und das Einbeziehen der Ergebnisse aus der Gradienten-PCR in spätere Experimente muss zwischen der Menge an PCR-Produkt und den entstandenen Primer-Dimeren abgewogen werden.

Die PCR-Produkte werden auf ein 2%-iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Dafür wird der gesamte Ansatz (25 µL) mit 5 µL Ladepuffer (verdünnt in 50%-igem Glycerin) versetzt und in die Geltaschen gegeben. Als Referenz werden 6 µL eines DNA-Standards (Gene Ruler 1 kb Plus) verwendet um die Größe der aufgetrennten DNA-Fragmente aus den Proben zu ermitteln. Die Gelelektrophorese läuft für 30 min bei 80-100 V bis die DNA-

Fragmente eine ausreichende Auftrennung aufzeigen. Auswertung und Aufnahme des Agarosegels erfolgen unter UV-Licht mittels eines Transilluminators (Dunkelhaube).

4.3.4.2 quantitative Real-Time-PCR (qPCR)

Prinzip der qPCR (Echtzeit-PCR)

Die Grundlagen der quantitativen Real-Time PCR wurden 1983 von Higuchi und Kollegen entwickelt (Higuchi et al., 1993). Dabei wird während der Amplifikation ein Fluoreszenzsignal generiert, welches sich proportional zur Menge an vorliegendem PCR Produkt verhält. Es ist eine Quantifizierung des PCR-Produktes in Echtzeit bzw. während jedes PCR-Zyklus möglich.

Für die Auswertung der Daten kann die Endpunktbestimmung angewendet werden, bei der aber aufgrund einer exponentiellen Amplifikation und des Erreichens einer Plateauphase keine Aussage über die Ausgangsmenge an DNA-Template getroffen werden kann. Eine Möglichkeit zur Bestimmung der DNA-Ausgangsmenge bietet die Analyse des Kurvenverlaufes. Dabei ist der Zeitpunkt (PCR-Zyklusnummer; C_t) bei dem innerhalb der exponentiellen Amplifikationsphase eine bestimmte DNA-Menge (Fluoreszenz) erreicht wird, zu der Ausgangsmenge an Target-DNA proportional. Je später dieser Punkt erreicht wird, umso weniger Moleküle der Target-DNA lagen in der Probe vor.

Bei der qPCR wird für jede untersuchte Probe in Echtzeit eine Kurve erstellt, die die Fluoreszenzänderung in den einzelnen Zyklen der PCR darstellt. Der Kurvenverlauf erreicht bei einer bestimmten Zyklus-Nummer ein Plateau, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass keine weitere Änderung der Fluoreszenz von dem optischen System im Real-Time-Gerät detektiert wird. Das heißt es wird kein weiteres Amplifikationsprodukt gebildet, weil die dNTP's, die Primer oder beide Komponenten aufgebraucht sind.

Als Detektionssystem für die Amplifikationsprodukte, die während der qPCR entstanden sind, dient SybrGreen. Dieses System quantifiziert neben den spezifischen PCR-Produkten die Vervielfältigung unspezifischer dsDNA. Um die PCR-Produkte zu detektieren wird eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Bei diesem Verfahren wird die Fluoreszenz der Reaktionsansätze, über eine Temperaturerhöhung von 65°C auf 95°C (1°C/min), stetig aufgezeichnet. Die unspezifischen PCR-Produkte (meist Primer-Dimere) weisen niedrigere Fluoreszenzänderungen auf und von den spezifischen Amplifikaten abweichende Schmelztemperaturen. Proben, bei denen kein eindeutiger spezifischer Peak auszumachen ist, werden für eine bessere Auswertung auf ein 2%-iges Agarosegel aufgetragen und analysiert.

[Dr. rer. nat. Norman Häfner, 2008]

Amplifikation mit dem AmpliTaq Gold™-Mix (Applied Biosystems) bzw. dem Mix FastStart Universal von Roche Diagnostics

Der für die qPCR verwendete PCR-Mix ist der AmpliTaq Gold™-Mix und die verwendete DNA-Polymerase die AmpliTaq Gold™-Polymerase der Firma Applied Biosystems. Dieser Mix und die dazugehörige Polymerase werden für die Methylierungsanalysen der klinischen Proben verwendet. Der PCR-Master-Mix wird nach den Angaben aus Tabelle 15 für methylierungs- und nicht-methylierungsspezifisches Primerpaar gemeinsam hergestellt. Um Pipettier-Ungenauigkeiten auszugleichen werden drei Reserveansätze mitpipettiert.

Tabelle 15 Zusammensetzung PCR-Mix AmpliTaq Gold-Mix für qPCR

| Bestandteil | 1 x-Ansatz |
|-------------------------------------|-------------------|
| PCR-Master-Mix (AmpliTaq™ Gold-Mix) | 2,5 µL |
| DMSO | 1,25 µL |
| Sybr-Green (Farbstoff) | 0,5 µL |
| Rox (Referenzfarbstoff) | 0,5 µL |
| dNTP | 0,6 µL |
| MgCl ₂ | 0,25 µL |
| Taq-Polymerase | 0,25 µL |
| H ₂ O | 16,15 µL |
| Primer for+rev (jeweils 5 pmol/µL) | 2 µL |
| Reaktionsvolumen | 24 µL |
| Target-DNA | 1 µL |
| Gesamtreaktionsvolumen | 25 µL |

Für verschiedene Tests wird der PCR-Mix FastStart Universal der Firma Roche Diagnostics verwendet. Dafür werden 20 µL-Ansätze hergestellt. Die Angaben zur Zusammensetzung dieses PCR-Mixes ist der Tabelle 16 zu entnehmen.

Tabelle 16 Zusammensetzung PCR-Mix FastStart Universal für qPCR

| Bestandteil | 1x-Ansatz |
|---|------------------|
| 2 x PCR-Mix FastStart Universal Sybr Green Master (Rox) von Roche Diagnostics | 10 µL |
| Primer F+R (jeweils 5 pmol/µL) | 2 µL |
| Nuklease-freies Wasser | 7 µL |
| Reaktionsvolumen | 19 µL |
| Target-DNA | 1 µL |
| Gesamtreaktionsvolumen | 20 µL |

Die Ansätze für jedes Primerpaar (für methylierungsspezifische und nicht-methylierungsspezifische qPCR) werden mit 24 µL (AmpliTaq™ Gold-Mix) bzw. 19 µL (FastStart Universal) auf 0,2-mL-PCR-Reaktionsgefäße aufgeteilt und 1 µL der jeweiligen Target-DNA (Proben und Kontrollen) hinzugegeben. Als Negativkontrolle wird 1 µL aqua dest. in den PCR-

Mix (24 μL bzw. 19 μL) eingesetzt. Jeder einzelne PCR-Ansatz besteht aus einem Gesamtreaktionsvolumen von 25 μL (bzw. 20 μL).

Die vorbereiteten Proben werden kurz anzentrifugiert. Das gesamte Probenset wird im Real-Time-Gerät ABI 7300 platziert und das Programm anhand Abbildung 18 durchgeführt.

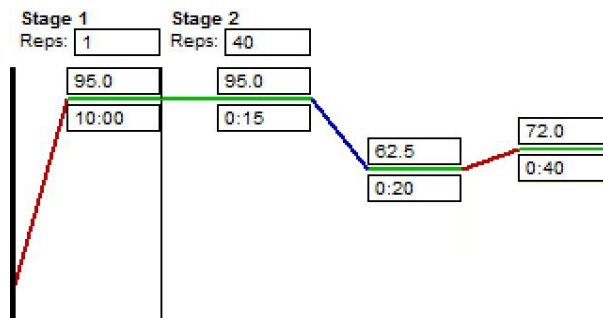


Abbildung 18 PCR-Programm für die qPCR

Um die Spezifität des gebildeten PCR-Produktes zu überprüfen, wird nach der Durchführung der PCR-Zyklen im Real-Time-Gerät ABI 7300 eine Schmelzkurve nach den Programm-Angaben aus Abbildung 19 erstellt.

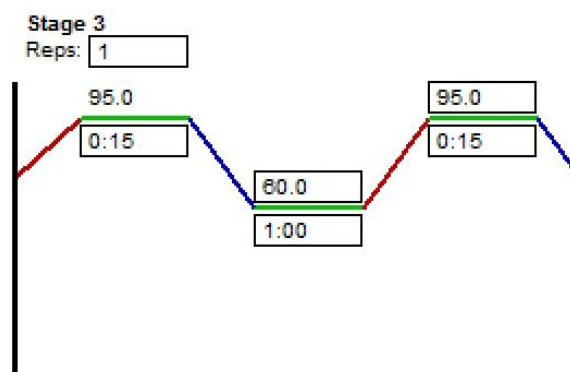


Abbildung 19 Schmelzkurven-Programm für die qPCR

Die Auswertung der quantitativen Real-Time-PCR und der Schmelzkurve erfolgen mit der Software Applied Biosystems Sequence Detection Software Version 1.2 (7300 System SDS software Core Application). Das Prinzip nach dem die Schmelzkurven-Daten generiert werden, ist im Kapitel Gradienten-PCR näher erläutert.

Die Ergebnisse werden durch Auftragen der PCR-Produkte (gesamter PCR-Ansatz) auf ein 2%-iges Agarosegel und elektrophoretische Auftrennung überprüft (Agarose-Gelelektrophorese). Die Gelelektrophorese läuft für 30 min bei 80 – 100 V bis die DNA und der DNA-Standard eine ausreichende Auftrennung aufzeigt.

4.3.5 Restriktion

4.3.5.1 allgemeines Prinzip

Als Restriktionsenzyme werden Proteine bezeichnet, die spezielle DNA-Sequenzen erkennen und an dieser Stelle gezielt schneiden. [URL-37] Restriktionsenzyme gehören zu den Endonukleasen, wobei Nukleasen Enzyme darstellen, die mittels einer Spaltung der Phosphodiester-Bindungen Nukleinsäuren abbauen können.

DNA-Sequenzen werden durch Restriktionsendonukleasen sequenzspezifisch gespalten, was sie zu einem wichtigen Werkzeug der Gentechnik macht. [URL-38] Die Antagonisten stellen sogenannte Ligasen dar. Diese Enzyme verknüpfen zwei Nukleotide eines DNA-Strangs durch eine Esterbindung. Das funktioniert nur bei einer intakten 5'-Phosphat-Gruppe des einen und einer 3'-OH-Gruppe des anderen Nukleotids. [URL-37] [URL-39]

Die Menge an Restriktionsenzym wird in Units (Einheiten) angegeben: Ein Unit ist die Enzym-Menge, die in einer Stunde bei optimalen Reaktionsbedingungen 1 µg DNA spaltet. [URL-38]

Die Restriktionsenzyme stammen aus Bakterien und haben die Fähigkeit artfremde DNA (z. B. virale DNA) zu erkennen und zu spalten, was man als Restriktion oder Verdau von Fremd-DNA bezeichnet. Zelleigene DNA wird nicht angegriffen, da die Nuklease-spezifischen Sequenzen mithilfe einer Methylierung geschützt werden. Bei dem Restriktionsprozess wird die 4 bis 6 Nukleotid lange spezifische Erkennungssequenz erkannt und die Phosphodiester-Brücken an dieser Stelle aufgespalten. Die der Aufspaltung zugrunde liegende Reaktion ist eine Hydrolyse der Phosphorsäurediester-Bindung in beiden Strängen. Die Spaltung kann auf zwei Arten verlaufen: symmetrisch oder versetzt in beiden Strängen. Bei der symmetrischen Aufspaltung kommt es zur Bildung glatter (*blunt ends*) Enden und bei der versetzten Restriktion zur Entstehung 3'- bzw. 5'-überhängender/klebriger Enden (*sticky ends*). [URL-38]

Blunt ends entstehen beim Schneiden in der Mitte an der gleichen Sequenzposition der Einzelstränge einer doppelsträngigen DNA. Sticky ends resultieren aus der Schneidevariante, wenn die Einzelstränge versetzt geschnitten werden und sich die Schnittstellen nicht gegenüber liegen. Von der Mitte der Erkennungssequenz aus liegen die beiden Schneidepunkte um den gleichen Betrag entfernt. Das Ergebnis des Schneideprozesses sind terminal betrachtet gleiche Endsequenzen bei beiden Fragmenten. [URL-37]

Die Basen der Erkennungssequenzen in der Target-DNA der meisten in der Gentechnik angewendeten Restriktionsendonukleasen weisen eine kreuzweise spiegelbildliche Anordnung auf, die als Palindrom bezeichnet wird. [URL-38]

Die Restriktionsenzyme werden in Endo- und Exonukleasen klassifiziert. Endonukleasen spalten DNA innerhalb des Polynukleotidstranges und Exonukleasen schneiden terminale (am Ende eines Polynukleotidstranges befindliche) Nukleinsäure-Monomere von der DNA ab.

Außerdem werden die Restriktionsendonukleasen in drei Typen eingeteilt: Typ I, II und III. [URL-37] Die Art der Erkennungs- und Schnittsequenz entscheidet über die Zugehörigkeit der Endonuklease zu einer dieser drei Gruppen (Typ I, II und III). [URL-38]

Restriktionsendonukleasen vom Typ I schneiden zufällig und mit einer unvorhersagbaren Entfernung von der Erkennungssequenz. Für die DNA-Spaltung wird Energie benötigt, die in Form von ATP und über den Transfer von Methylgruppen während der Spaltungsreaktion bereitgestellt wird. Typ-II-Restriktionsendonukleasen sind die am meisten vorkommenden und am häufigsten verwendeten Schneide-Enzyme, welche eine exakte palindromische Erkennungssequenz aufweisen. Diese besitzt eine zweizählige Symmetrieachse und umfasst meist 4 bis 8 palindromische Basenpaare. Typ II-Endonukleasen benötigen keine Zufuhr von Energie (ATP) und sind kein Träger einer Methyltransferase-Aktivität. Sie schneiden in den beiden bereits vorgestellten Modi: glatt (blunt ends) oder klebrig (sticky ends).

Typ-III-Restriktionsendonukleasen setzen den Schnitt ungefähr 20 bis 25 Basenpaare entfernt von ihrer Erkennungssequenz an. Die Reaktion benötigt Energie und verfügt über eine Methyltransferase-Aktivität. [URL-37]

4.3.5.2 Restriktionsanalyse zur Überprüfung verschiedener Parameter

Welches Enzym für den jeweiligen Verdau und die gestellte Aufgabe geeignet ist, wird mithilfe der Internetplattform NEBcutter recherchiert. Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme sind in Tabelle 17 dargestellt.

Tabelle 17 Überblick über die verwendeten Restriktionsendonukleasen und deren Eigenschaften [URL-40]

| Restriktions-enzym | Erkennungs-sequenz | Schnittstelle | Überhang | Typ | Verwendung |
|--------------------|--------------------|---|-----------|----------------------|------------------------------------|
| PstI | CTGCAG | 5'...CTGCAG...3' 3'...GACGTC...5' | TGCA- 3' | Typ II-Endo-nuklease | Überprüfung Klonierung |
| PsiI | TTATAA | 5'...TTATAA...3' 3'...AATATT...5' | blunt | Typ II-Endo-nuklease | Plasmid-Linearisierung |
| NotI | GCGGCCGC | 5'...GCGGCCGC...3' 3'...CGCCGCG...5' | 5' - GGCC | Typ II-Endo-nuklease | Überprüfung Plasmid-Methylierung |
| TaqI | TCGA | 5'...TCGA...3' 3'...AGCT...5' | 5' - CG | Typ II-Endo-nuklease | Überprüfung Bisulfit-Konvertierung |

Überprüfung der Klonierung – Restriktionsverdau mittels Pst I

Zur Überprüfung des Klonierungserfolges wird das rekombinante Plasmid mit der Restriktionsendonuklease Pst I verdaut. Das Enzym schneidet das Plasmid an zwei Stellen – im Vektor außerhalb des Inserts und innerhalb des Inserts.

Der Master-Mix für den Restriktionsverdau wird nach den Angaben in Tabelle 18 angesetzt. Es wird ein Ansatz mehr pipettiert, um Pipettier- Ungenauigkeiten auszugleichen.

| Tabelle 18 Restriktionsansatz für den Verdau mittels Pst I | |
|---|------------------|
| | 1x-Ansatz |
| Nuklease-freies Wasser | 14 µL |
| 10x NEBuffer 3 (New England Biolabs) | 2 µL |
| BSA | 2 µL |
| Enzym Pst I (20 U/µL) | 1 µL |
| Reaktionsvolumen | 19 µL |
| Plasmid-DNA | 1,5 µL (0,5 µg) |
| Gesamtreaktionsvolumen | 20,5 µL |

Für jeden Restriktionsansatz werden 19 µL des Master-Mixes in ein 0,5 mL-Reaktionsgefäß gegeben und 1,5 µL der Plasmid-DNA dazugegeben. Die Ansätze werden für 1,5 h im Brutraum bei 37 °C inkubiert.

Die Ansätze (21,5 µL) werden auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen. Als Kontrolle wird das unverdaute Plasmid in die Gelelektrophorese eingesetzt. Dafür werden 1,5 µL auf 20 µL mit aqua dest. aufgefüllt und der gesamte Ansatz in die Geltaschen pipettiert.

Linearisierung des rekombinanten Plasmids – Restriktionsverdau mittels Psi I

Um aus dem zirkulären Vektor (Plasmid) ein lineares DNA-Molekül zu generieren, wird die Plasmid-DNA mittels der Restriktionsendonuklease Psi I verdaut. Lineare DNA lässt sich besser in die PCR einsetzen, da die Amplifikation mittels PCR-Verfahren an linearer DNA optimaler abläuft als an zirkulärer Plasmid-DNA. Das Enzym schneidet das Plasmid einmal und linearisiert es. Dabei ist darauf zu achten, dass das Enzym das Plasmid nicht zu nah an den Insert-Grenzen verdaut.

Für den Restriktionsansatz mit Psi I werden die Angaben aus Tabelle 19 herangezogen. In einem 50 µL-Ansatz müssen 5 µg DNA enthalten sein.

| Tabelle 19 Restriktionsansatz für den Verdau mittels Psi I | |
|---|------------------|
| | 1x-Ansatz |
| Nuklease-freies Wasser | 28 µL |
| Puffer CutSmart (New England Biolabs) | 5 µL |
| Enzym Psi I (5 U/µL) | 2 µL |
| Reaktionsvolumen | 35 µL |
| Plasmid-DNA | 15 µL (5 µg) |
| Gesamtreaktionsvolumen | 50 µL |

Jeder Ansatz besteht aus einem Mix von 35 μL mit allen für die Reaktion notwendigen Komponenten. Am Ende werden 15 μL (5 μg) der jeweiligen Plasmid-DNA hinzugegeben, sodass ein Gesamtreaktionsvolumen von 50 μL erreicht wird. Die Proben werden über Nacht bei 37 °C inkubiert und am nächsten Tag auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen. Dazu werden 5 μL aus dem Restriktionsansatz entnommen und mit aqua dest. auf 20 μL aufgefüllt. Als Kontrolle wird eine ungeschnittene Plasmid-Probe mitgeführt (5 μL mit aqua dest. auf 20 μL auffüllen). Die Lösungen werden mit 5 μL verdünntem Ladepuffer vorbereitet und in die Gelelektrophorese eingesetzt.

Überprüfung der in-vitro-Methylierung – Restriktionsverdau mittels Not I

Durch Restriktionsverdau mit dem Enzym Not I wird der Erfolg der Plasmid-Methylierung überprüft. Das Enzym schneidet die DNA sequenzspezifisch und in Abhängigkeit von der CpG-Methylierung innerhalb der Erkennungssequenz. Ausschließlich die DNA-Moleküle mit unmethylierten Cytosinen innerhalb der Erkennungssequenz werden von dem Enzym geschnitten. Der Master-Mix wird nach der Anleitung aus Tabelle 20 zusammengegeben.

Tabelle 20 Restriktionsansatz für den Verdau mittels Not I

| | 1x-Ansatz |
|--|--------------------------------------|
| Nuklease-freies Wasser | 12 μL |
| 10x NEBuffer 3.1 (New England Biolabs) | 2 μL |
| Enzym Not I (10 U/ μL) | 1 μL |
| Reaktionsvolumen | 15 μL |
| Plasmid-DNA | 5 μL (0,5 μg) |
| Gesamtreaktionsvolumen | 20 μL |

Nach Aufteilung des Master-Mixes zu je 15 μL auf neue 0,5-mL-Reaktionsgefäße, werden je 5 μL methylierte Plasmid-DNA zugegeben. Als Kontrolle für den Verdau werden jeweils 5 μL des unmethylierten Plasmids zu den vorbereiteten Ansätzen pipettiert. Es werden 5 μL methylierte Plasmid-DNA aus dem Methylierungsansatz und 5 μL unmethylierte Plasmid-DNA aus dem Nichtmethylierungsansatz in den Verdau eingesetzt (siehe Kapitel Methylierungsanalyse – Methylierung der Plasmid-DNA).

Methylierter und unmethylierter Restriktionsverdau umfassen jeweils ein Volumen von 20 μL und werden für 1 h bei 37 °C im Brutraum inkubiert und bis zum Auftragen auf ein 2%-iges Agarosegel im Kühlschrank gelagert.

Die Restriktionsansätze werden in eine Agarosegel-Elektrophorese eingesetzt und die geschnittene Plasmid-DNA im Gel aufgetrennt und sichtbar gemacht.

Überprüfung der Bisulfitkonvertierung nach qPCR – Restriktionsverdau mittels Taq α I

Durch Restriktionsverdau mit dem Enzym Taq α I wird der Erfolg der Bisulfitkonvertierung an der Plasmid-DNA (Kontroll-Plasmid) nach methylierungsspezifischer qPCR nachgewiesen. Das Enzym schneidet zwischen einer Cytosin- und einer Thymin-Base. Bei methylierter DNA liegen diese Cytosin-Basen nach der Bisulfit-Behandlung weiterhin als Cytosine vor, wohingegen unmethylierte Cytosine durch die Bisulfit-Behandlung in Uracil umgewandelt sind. Das Enzym schneidet ausschließlich methylierte Cytosine oder nicht vollständig Bisulfit-konvertierte DNA-Moleküle, wohingegen unmethylierte Cytosin-Basen, als Uracil vorkommend, von dem Enzym Taq α I nicht erkannt werden.

In den Verdau werden methylierte Bisulfit-behandelte PCR-Produkte, die mit methylierungs- und nicht-methylierungsspezifischen Primern amplifiziert wurden, eingesetzt. Außerdem wird unmethylierte Bisulfit-behandelte Plasmid-DNA, nach der Amplifikation mit methylierungs- und nicht-methylierungsspezifischen Primern (methylierungsspezifische qPCR), mit dem Enzym Taq α I verdaut. Der benötigte Master-Mix für den Restriktionsverdau wird nach der Anleitung aus Tabelle 21 zusammengefügt.

Tabelle 21 Restriktionsansatz für den Verdau mittels Taq-alphaI

| | 1x-Ansatz |
|---------------------------------------|-----------------------------|
| Nuklease-freies Wasser | 9 μ L |
| Puffer CutSmart (New England Biolabs) | 2 μ L |
| Enzym Taq α I (20 U/ μ L) | 1 μ L |
| Reaktionsvolumen | 12 μL |
| PCR-Produkt | 8 μ L |
| Gesamtreaktionsvolumen | 20 μL |

Nach der Aufteilung des Master-Mixes zu je 12 μ L auf neue 0,5-mL-Reaktionsgefäße, werden je 8 μ L DNA-Probe aus der Methylierungsspezifischen PCR – MSP (PCR-Produkt) zu dem Ansatz gegeben, sodass das Gesamtreaktionsvolumen 20 μ L beträgt.

Um den Erfolg eines Restriktionsverdaus zu überprüfen, werden die Proben mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Konzentration der Agarose (1% oder 2%) richtet sich nach der Größe der verdauten und aufzutrennenden DNA-Fragmente. Als Kontrolle wird jedes Plasmid unverdaut auf das Gel aufgetragen. Dafür wird die jeweilige Menge an unverdauter Plasmid-DNA, die auch in den Verdau eingesetzt wurde, mit aqua dest. auf 20 μ L aufgefüllt. Zu den Restriktionsansätzen und den Kontroll-Ansätzen werden jeweils 5 μ L verdünnter Ladepuffer zugegeben und der komplette Ansatz aufgetragen (Ausnahme: Verdau mit Enzym Psi I). Der Ladepuffer wird vor seiner Verwendung in 50 %-igem Glycerin verdünnt. Die vorbereiteten Proben werden neben 6 μ L eines Standard (Gene Ruler 1 kb Plus) vollständig auf

das Gel aufgetragen. Der Standard dient als Referenz um die Größe der aufgetrennten DNA-Fragmente zu ermitteln. Die Laufzeit beträgt 30 bis 40 min bei 80 bis 100 Volt, bis Standard und Proben ausreichend aufgetrennt im Gel vorliegen. Das Gel wird mittels einer Dunkelhaube unter UV-Licht ausgewertet und fotografiert.

4.3.6 Sequenzierung

4.3.6.1 Allgemeines Prinzip der Sanger-Sequenzierung

Die Sequenzierung nach Sanger wird auch als Didesoxy-Sequenzierung bezeichnet. Diese Methode wird mit einer linearen PCR-Amplifikation gekoppelt um die Sensitivität zu erhöhen. [Sanger et al., 1977] Der DNA-Abschnitt, dessen Sequenz entschlüsselt werden soll, wird aufgeschmolzen, sodass die beiden Einzelstränge vorliegen. Am 3'-Ende eines Einzelstranges wird ein komplementäres DNA-Oligonukleotid hybridisiert (Primer). Dieser kurze doppelsträngige Bereich dient der DNA-Polymerase als Startsequenz. [URL-41]

Die PCR wird als lineare Amplifikation mit einem Primer durchgeführt. [Sanger et al., 1977]

Der Sequenzierungsansatz wird in vier gleiche Teile zerlegt und jeweils eines der vier möglichen 2', 3'-Didesoxyribonukleosidtriphosphate zugegeben, die jeweils keine freie Hydroxylgruppe besitzen, so dass im Verlauf der PCR zufällige Abbrüche der Polymerasereaktion auftreten. Dieser sequenzspezifische (aufgrund der Komplementarität) Kettenabbruch kann an jeder, zum Didesoxy-Nukleotid der Target-DNA komplementären Position erfolgen. [URL-41] [Sanger et al., 1977]

Das Ergebnis dieser PCR ist eine Ansammlung unterschiedlich langer DNA-Fragmente mit einer Länge von 10 bis 1000 Basen sowie einer definierten endständigen Base. [Sanger et al., 1977]

Die unterschiedlich langen Bruchstücke in dem Gemisch werden in einer Gelelektrophorese aufgetrennt. Dazu werden die Fragmente in ein 6 %-iges denaturierendes Harnstoff-PAA-Gel gegeben. Die Trennleistung dieses Gels liegt bei einem Nukleotid Längenunterschied, um die unterschiedlichen Längen der DNA-Fragmente auf das Nukleotid genau bestimmen zu können. Die Abfolge der Basensequenz kann direkt aus dem Gel abgelesen werden. [URL-41] [Sanger et al., 1977]

4.3.6.2 Sequenzierungsanalyse in einem externen Sequenzier-Labor (SeqLab)

Die Proben, bei denen die Klonierung des FoxP3-Gens in das Plasmid und deren Vermehrung in E.coli-Bakterien am besten funktioniert haben, werden sequenziert. Diese Einschätzung wird anhand des Agarosegels nach dem Verdau mit Pst I getroffen.

Für die Sequenzierung wird die Dienstleistung des Sequenzierlabors „Seqlab – Sequence Laboratories Göttingen“ in Anspruch genommen. Als Methode wird die Sanger-Sequenzierung eingesetzt. Der vorzubereitende Sequenzierungsansatz, der an das externe Labor geschickt wird, ist Tabelle 22 zu entnehmen.

Tabelle 22 Zusammensetzung des Sequenzierungs-Ansatzes

| Bestandteil | Klon 1-1 | Klon 2-1 |
|---------------------------------------|--------------|---------------|
| aufgereinigte Plasmid-DNA | 2 µL (1 µg) | 4 µL (1,4 µg) |
| Primer 20 pmol/µL (767 M13R/766 M13U) | 1,5 µL | 1,5 µL |
| H ₂ O (aqua dest.) | 11,5 µL | 9,5 µL |
| Reaktionsvolumen | 15 µL | 15 µL |

Je nach der Konzentration der aufgereinigten Plasmid-DNA, werden unterschiedliche DNA-Volumina zu den jeweiligen Ansätzen gegeben. Als Forward-Primer wird in die Sequenzierung der Primer 766 M13U eingesetzt. Für die Reverse-Synthese nutzt man den Reverse-Primer 767 M13R.

4.3.7 Methylierungsanalyse

4.3.7.1 Methylierung der Plasmid-DNA (Kontroll-Plasmid)

Die zirkuläre Plasmid-DNA (ohne Restriktionsverdau mit Psi I), welche das Insert FoxP3 trägt, wird in-vitro methyliert. Die Methylierung erfolgt durch das Enzym Sss I Methylase (4 U/µL) und als Methylgruppen-Donor, das heißt als Substrat für die Methyltransferase, fungiert S-Adenosyl-Methionin (SAM).

In Vorbereitung auf die Herstellung des Methylierungsansatzes, muss die S-Adenosylmethionin-Stocklösung verdünnt werden. Dazu wird die 32 mM Stocklösung auf eine 1600 µM verdünnte Arbeitslösung gebracht (1:20-Verdünnung). Dazu werden 1 µL der SAM-Stocklösung (32 mM) mit 19 µL Nuklease-freiem Wasser gemischt.

Der Methylierungsansatz wird nach den Angaben in Tabelle 23 angesetzt.

Tabelle 23 Zusammensetzung des Methylierungsansatzes

| Bestandteil | 1x-Ansatz |
|--------------------------------------|--|
| Nuklease-freies Wasser | entsprechendes Volumen um Methylierungsansatz auf 20 µL aufzufüllen |
| 10x NEBuffer 2 (New England Biolabs) | 2 µL |
| 1:20-verdünntes SAM | 2 µL |
| Sss I Methylase (4 U/µL) | 1 µL |
| Target-DNA | 2 µg |
| Gesamtreaktionsvolumen | 20 µL |

Der Master-Mix (Mehrfach-Ansatz ohne Target-DNA) wird als 1x-Ansätze auf 0,5 mL-Reaktionsgefäße aufgeteilt. Es werden 2 µg des jeweiligen zirkulären aufgereinigten (aus Transformationsansatz in *E. coli*) Plasmids hinzugegeben. Der gesamte 1x Ansatz umfasst ein Volumen von 20 µL, wobei Differenzen durch unterschiedliche Zugaben von weniger oder mehr DNA-Lösung mit Nuklease-freiem Wasser ausgeglichen werden.

Die Methylierungsansätze werden für 2 h bei 37 °C im Brutraum inkubiert.

Als Kontrolle für die spätere Gelelektrophorese wird pro Plasmid-Probe eine unmethylierte Kontrolle mitgeführt (Nichtmethylierungsansatz). Dafür werden 2 µg Plasmid-DNA in Nuklease-freiem Wasser auf einen 20 µL-Ansatz aufgefüllt. Das nicht-methylierte Plasmid wird im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

Um die Effizienz der Methylierung zu erhöhen werden die Plasmide zweimal methyliert. Nachdem der Ansatz nach Tabelle 23 hergestellt und die Inkubation von 2 h bei 37 °C durchgeführt ist, werden erneut 2 µL 1:20 verdünntes Adenosylmethionin (SAM) und 1 µL Enzym Sss I Methylase zu jedem der Ansätze hinzugegeben. Die Doppel-Methylierungsansätze werden bei 37 °C für 2 h inkubiert.

4.3.7.2 Bisulfit-Behandlung der DNA

Prinzip der Bisulfit-Behandlung

An isolierter DNA lässt sich die natürlicherweise vorhandene oder die in-vitro erzeugte Methylierung durch Bisulfitkonversion fixieren (chemische Behandlung der DNA). [URL-42] [Ballestar & Esteller, 2008]

Bei der Methode wird die DNA mit Natrium-Bisulfit behandelt und die unmethylierten Cytosine chemisch modifiziert, das heißt in Uracil umgewandelt (deaminiert). Im Gegensatz dazu hat die Behandlung von 5-Methyl-Cytosinen (methylierte Cytosine) mit Natriumbisulfit keinen Effekt. Die 5-Methyl-Cytosine sind durch ihre Methylgruppe am fünften Kohlenstoff-Atom des Pyrimidinringes der Nukleobase vor der chemischen Modifikation geschützt.

Der chemische Verlauf der Bisulfit-induzierten hydrolytischen Desaminierung von Cytosin zu Uracil ist in Abbildung 20 dargestellt und setzt sich aus den drei Teilen Sulfonierung (Schritt 1), hydrolytische Desaminierung (Schritt 2) und Alkali-Desulfonierung (Schritt 3) zusammen. [Wagener & Müller, 2010; Hütter, 2013] Cytosin-Moleküle sind in der Lage über ihr C5-Atom Addukte mit zahlreichen Substanzen, wie dem Bisulfit-Ion (HSO_3^-) zu bilden. Dieses Cytosin-Bisulfit-Addukt wird in wässriger Lösung unter Abspaltung der NH_2 -Gruppe zum Uracil- SO_3^- -Derivat (Uracil-Sulfonat) desaminiert. Mit Hilfe einer abschließenden Alkali-Behandlung wird dieses Derivat zu Uracil desulfoniert (siehe Abbildung). [Maria Thannhäuser, 2005]

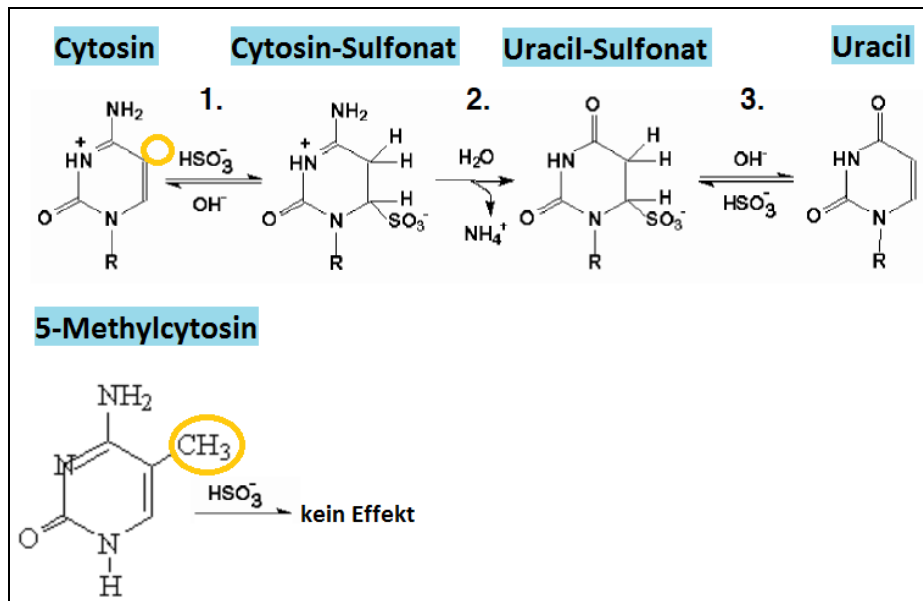


Abbildung 20 Prinzip der Natriumbisulfit-Methode zum Nachweis von DNA-Methylierung
 Schritt 1: Sulfonierung, Schritt 2: Hydrolytische Desaminierung, Schritt 3: Alkali-Desulfonierung
 [Wagener & Müller, 2010; Hütter, 2013; Maria Thannhäuser, 2005]

Mit der Natriumbisulfit-Methode können nicht methylierte Cytosinreste innerhalb eines DNA-Abschnitts schnell und selektiv in Uracilreste überführt werden, wohingegen methylierte Cytosin-Reste unverändert bleiben. Es wird mit einem chemischen Verfahren ein Sequenzunterschied zwischen methyliert und nicht-methyliert vorliegenden Cytosinen in der DNA induziert. Die Analyse der Bisulfit-konvertierten DNA und des eingeführten Sequenzunterschiedes erfolgt mithilfe der qPCR, welche unter methylierungsspezifischen oder nicht-methylierungsspezifischen Bedingungen durchgeführt wird. [Wagener & Müller, 2010; Hütter, 2013]

Die langsame Reaktion mit Natriumbisulfit wird bei niedrigem pH-Wert (pH 5,0) katalysiert und findet Einzelstrang-spezifisch statt. [Maria Thannhäuser, 2005]

Die DNA liegt nach der Bisulfitbehandlung einzelsträngig und stark fragmentiert vor, daher ist eine geeignete Bindematrix bei der nachfolgenden Reinigung besonders wichtig. Dafür wird die DNA an eine Säule gebunden, aufgereinigt und eluiert. Die Reinigung nach der chemischen Behandlung ist notwendig um die DNA in die MSP (Methylierungsspezifische PCR) einzusetzen. [URL-42] [Ballestar & Esteller, (2008)]

Bisulfit-Behandlung: EZ DNA Methylation™ Gold - Kit der Firma Zymo Research

Für die Bisulfit-Behandlung der DNA wird das „EZ DNA Methylation-Gold“-Kit der Firma Zymo Research verwendet. In die Bisulfit-Konvertierung werden 400 ng DNA eingesetzt. Ist die vorliegende DNA-Konzentration zu hoch, muss eine Vorverdünnung (1:10) der entsprechenden DNA-Probe hergestellt werden. Das entsprechende Volumen mit einer DNA-Menge von 400 ng DNA wird auf 20 µL mit aqua dest. aufgefüllt.

In Vorbereitung auf die Konversion mit Natrium-Bisulfit werden in ein Reaktionsgefäß mit CT Conversion Reagent (pulverförmig) aqua dest., M-Dilution Buffer sowie M-Dissolving Buffer gegeben. Dieser Bisulfit-Master-Mix wird bei 50 °C in einem Thermomixer gemischt und gevortext bis das pulverförmige Conversion Reagent vollständig gelöst vorliegt. Der im Laufe des Experiments benötigte Waschpuffer (M-Wash Buffer) muss vor seinem Gebrauch mit 96 %-igem Ethanol versetzt werden. Dazu wird dem M-Wash Buffer (Konzentrat) 96%-iger Ethanol beigemischt. Das vorbereitete CT Conversion Reagent (Bisulfit-Master-Mix) wird mit der vorbereiteten DNA-Lösung (20 µL-Ansatz) versetzt. Durch Anschneiden oder Auf- und Abpipettieren sowie kurzes Anzentrifugieren wird der Bisulfit-Ansatz gemischt. Die Probenröhrchen mit den Bisulfit-Ansätzen werden in einem PCR-Cycler (Eppendorf) platziert und das folgende Programm anhand angewendet:

- 1. Denaturierung:** 98 °C für 10 min
- 2. Sulphonierung:** 64 °C für 2,5 h
3. Lagerung bei 4°C für bis zu 20 h .

Das Programm für die Bisulfit-Behandlung läuft über Nacht. Bei einer Temperatur von 98 °C denaturiert die doppelsträngige DNA in zwei Einzelstränge, da die Bisulfit-Konvertierung ausschließlich an einzelsträngiger DNA abläuft. Es schließt sich die Sulfonierung bei 64 °C an, bei der nicht-methylierte Cytosin-Basen durch eine Additionsreaktion mit dem Bisulfit-Anion in Cytosin-Sulfonat umgewandelt werden. [URL-43]

Die Bisulfit-Ansätze werden jeweils mit M-Binding Buffer auf eine Säule gegeben, wobei die DNA an die Matrix der DNA-Säule bindet. Die DNA-Säule wird bei höchster Geschwindigkeit (13.600 x g) für 30 sec. zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Die Zymo Spin™-DNA-Säule wird mit M-Wash Buffer gewaschen und die Wasch-Lösung bei höchster Geschwindigkeit (13.600 x g) für 30 sec. zentrifugiert. Nach Zugabe des Desulphonation Buffers auf die Säule folgt eine zwei-minütige Inkubation. Dabei kommt es durch hydrolytische Deaminierung zur Reaktion von unmethyliertem Cytosin-Sulphonat zu Uracil-Sulphonat und in der Folge im alkalischen Milieu durch alkalische Desaminierung zur Umwandlung von Cytosin-Sulfonat in Uracil. [URL-43]

Nach der Inkubation werden die Reaktionsgefäße für 30 sec. bei höchster Geschwindigkeit (13.600 x g) zentrifugiert und der Durchfluss entfernt. Es wird M-Wash Buffer auf die Säule gegeben und bei höchster Geschwindigkeit (13.600 x g) für 30 sec. zentrifugiert. Dieser Waschschrift wird wiederholt. Nach dem Waschen der DNA, muss diese von der DNA-Säule gelöst werden (Elution). Die Elution erfolgt durch Zugabe von 20 µL vorgewärmtem M-Elution Buffer und dessen 2-minütiger Inkubation auf der Matrix der Säule. Die Proben werden für 30 sec. bei Höchstgeschwindigkeit (13.600 x g) zentrifugiert und die DNA von der Matrix der Säule eluiert. Dabei ist darauf zu achten, dass die Deckel der Reaktionsgefäße in die Mitte der Zentrifuge ragen, um ein Abbrechen zu vermeiden. Nach der Zentrifugation liegt die Bisulfit-konvertierte DNA aufgereinigt in dem 1,5 mL-Reaktionsgefäß vor.

4.3.7.3 Prinzip der Methylierungsspezifischen PCR (MSP)

Die Analyse von Methylierungsstatus und Methylierungsmuster einer DNA wird mithilfe der Methylierungsspezifischen PCR (MSP) durchgeführt. Mittels methylierungsspezifischer PCR können zum Beispiel größere Tumorserien auf Methylierungen in einem oder mehreren Genen analysiert werden. Die Methode ist sehr schnell und sensitiv – in einem DNA-Gemisch kann ein Anteil von 0,1 % methylierter DNA erfasst werden.

Die Methode der MSP basiert auf Grundlage einer Bisulfitkonvertierung (siehe Abbildung 21.1.) der DNA und der Detektion der in vitro erzeugten Sequenzunterschiede zwischen methylierten und unmethylierten Cytosinen. [Hütter, 2013; Maria Thannhäuser, 2005]

Es entstehen je nach Methylierungsstatus der DNA unterschiedliche Produkte, für die man in der nachfolgenden PCR jeweils spezifische Primer einsetzt (siehe Abbildung 21.2.). In den entsprechenden Ansätzen wird also nur entweder die ursprünglich methylierte oder die unmethylierte DNA vervielfältigt. Je nachdem, bei welchem Primer (für methylierungs- oder nicht-methylierungsspezifische Amplifikation) ein Produkt entsteht, war die Ursprungs-DNA methyliert oder unmethyliert (siehe Abbildung 21.3.). [URL-36] [Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R, 1992; Reidhaar-Olson JF, Hammer J, April 2011; Mullis KB, December 8, 1993; Mullis & Faloona, (1987a)]

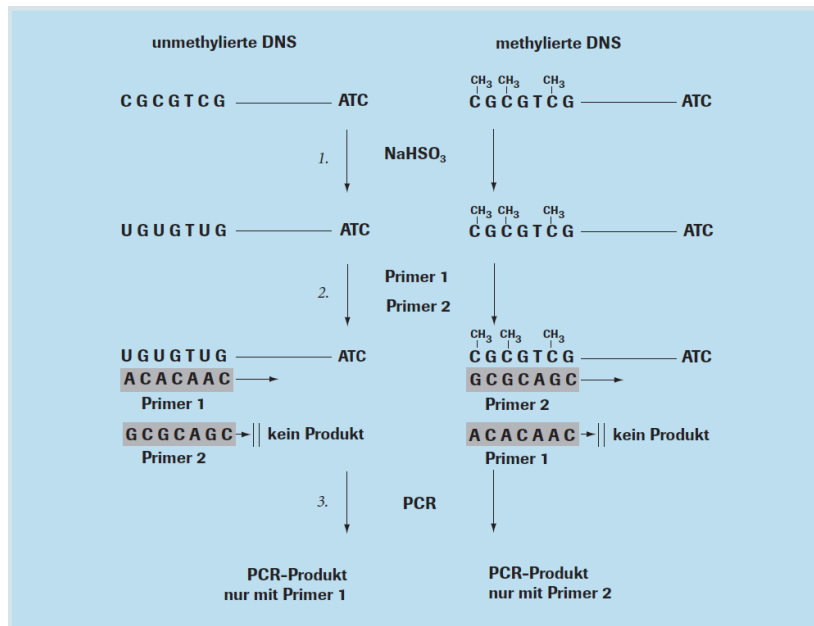


Abbildung 21 stillgelegte Gene erkennen: Methylierungs-spezifische PCR (MSP)
 ATC wird nach Transkription der DNA in UAG umgewandelt (mRNA), was das Stopcodon bildet (Abbruch der Translation und damit der Proteinbiosynthese) [URL-36]

Die verwendeten Primerpaare für den methylierten und den unmethylierten Bereich unterscheiden sich trotz identischer Bindungsregion in ihrer Sequenz (siehe Abbildung 22). Reverse-Primer für die Amplifikation unmethylierter DNA weisen in ihrer Sequenz statt dem ursprünglichen Guanin generell ein Adenin auf, da dieses mit Uracil (durch Natriumbisulfit deaminiertes Cytosin) ein Basenpaar ausbilden kann. Forward-Primer für unmethylierte Promotorsequenzen besitzen statt des Cytosins ein Thymin. In den Reverse-Primern, die an methylierte DNA binden sollen, bleiben die Guanine, die komplementär zum Cytosin der CpG-Sequenzen liegen, in der Primersequenz erhalten. Der Grund liegt darin, dass die 5-Methyl-Cytosine innerhalb der methylierten DNA nicht durch Natriumbisulfit deaminiert werden und daher unverändert vorliegen. [Hütter, 2013]

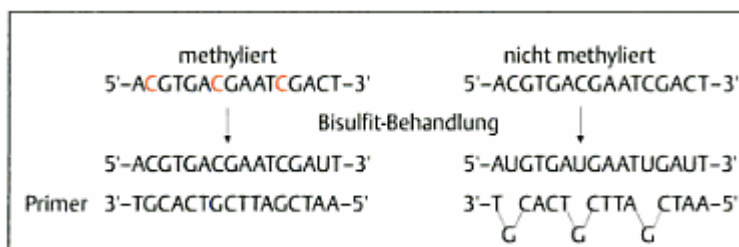


Abbildung 22 Methylierungsspezifische PCR: methylierte Cytosinreste = rot [Wagener & Müller, 2010]

Guanine, welche nicht zu den Cytosinen in den CpG-Sequenzen gehören, werden im neu synthetisierten Strang durch die Nukleobase Adenin ersetzt. Bei den Forward-Primern werden Cytosine nur durch Thymin ersetzt, wenn sie nicht in einem CpG-Kontext vorkommen. [URL-

44] Das MSP-Verfahren liefert ein semiquantitatives Ergebnis bezüglich der untersuchten Region. [Hütter, 2013]

Allgemein wird 5-Methylcytosin (methyliertes Cytosin) innerhalb der MSP als Cytosin amplifiziert und zum unmethylierten Cytosin, das in Uracil umgewandelt vorliegt, die Nukleobase Adenin komplementär gepaart. Das heißt Uracile werden in den PCR-Experimenten wie Thymin mit Adeninen gepaart und komplementiert. Positionen, an denen in der nicht mit Bisulfit behandelten DNA Cytosin und in der mit Bisulfit behandelten DNA Thymin detektiert werden, liegen ursprünglich methyliert vor. Damit werden methylierte von unmethylierten Cytosinen unterschieden. [Wagener & Müller, 2010; Ballestar & Esteller, 2008] [URL-42]

Die Nachteile des Verfahrens liegen im Fehlen quantitativer Informationen und in der Nachweis-Einschränkung auf CpG-Dinukleotide innerhalb der beiden Bindungsstellen der jeweiligen Primer. Die Primerpaare für eine methylierungs- und eine nicht-methylierungsspezifische Detektion werden an den gleichen Proben angewendet. Je nachdem wieviel Produkt von dem einen oder dem anderen Primerpaar amplifiziert wird, liegt die Bisulfit-behandelte Probe methyliert oder unmethyliert vor. Die in der PCR erhaltenen Produkte werden in einem 2%-igen Agarosegel aufgetrennt und ausgewertet. [Maria Thannhäuser, 2005]

4.4 Arbeiten mit RNA

4.4.1 RNA-Isolation und –Aufreinigung

Die RNA wird mit dem Kit „RNA isolation – NucleoSpin®RNA“ der Firma Macherey Nagel aus Geweben von Ovarialkarzinom-Patientinnen gewonnen (klinische Proben) und aus Blut (CD8⁺ und CD8⁻ T-Lymphozyten) sowie aus den Zellen einer Ovarialkarzinom-Zelllinie (SKOV3-Zelllinie) isoliert und aufgereinigt. Die RNA aus den CD8-positiven und CD8-negativen T-Lymphozyten sowie aus der Zelllinie werden als Kontrollen für den Assay verwendet. Die CD8-positiven und CD8-negativen Zellen werden mittels FACS-Analyse (siehe Kapitel 4.4.4 FACS-Analyse) aus Blut gewonnen. Die klinischen RNA-Proben werden aus Schnitten von Geweben der Ovarialkarzinom-Patientinnen isoliert und aufgereinigt. Dafür werden von Tumorböcken 10 µm dicke Gefrierschnitte mit dem Gefriermikrotom geschnitten und 12 dieser Schnitte (Größe eines 1 cent- bzw. 2 cent-Stücks) mit einem maximalen Gesamtgewicht von 30 mg in die RNA-Isolation eingesetzt.

Vor der Isolation der RNA müssen rDNase und Waschpuffer vorbereitet werden. Das Enzym rDNase (RNase-frei) liegt lyophilisiert vor und muss in RNase-freiem Wasser durch mehrmaliges Invertieren und eine einminütige Inkubation gelöst (rekonstituiert) werden. Das Enzym rDNase ist sehr empfindlich gegenüber mechanischer Beanspruchung. Das Waschpuffer-Konzentrat (RA3) wird mit 96%-igem Ethanol versetzt und bei Raumtemperatur gelagert.

Zellyse

Zu den Proben (Zellpellet oder Gewebe) werden Lysepuffer (Buffer RA1) und β -Mercaptoethanol hinzugegeben. Der Lysepuffer bricht die Zellen auf, sodass der Zellinhalt austreten kann. β -Mercaptoethanol wird genutzt um Ribonukleasen zu eliminieren, die während der Zellyse ausgetreten sind. Die Anwendung der Chemikalie führt zur Zerstörung der Disulfid-Brücken innerhalb von Proteinen und zur Auflösung der Proteinstruktur selbst sowie zu einer irreversiblen Inaktivierung der Proteine. Dadurch wird vermieden, dass die RNA durch Ribonukleasen abgebaut wird und die RNA-Ausbeute sinkt. [URL-45] Die mit dem Puffer und dem β -Mercaptoethanol vorbereiteten Proben werden stark gevortext um eine gute Durchmischung zu gewährleisten und über Nacht im -80-Tiefkühlschrank gelagert. Die RNA-Isolierung wird am darauffolgenden Tag fortgesetzt.

Filtration des Lysats

Die Viskosität des Lysats wird durch Filtration reduziert, indem die lysierten Zellbestandteile mittels einer porösen Säule aus der Lösung entfernt werden. Nach der Zentrifugation bleiben die Zellbestandteile in der Säule und die RNA als Filtrat zurück. Falls während der Zentrifugation ein Pellet entsteht (abhängig von der Masse der Probe), wird der Überstand aus dem Collection Tube abgenommen und das Filtrat in ein neues 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt.

Anpassen der Bedingungen für die RNA-Bindung

Um die Bedingungen für die RNA-Bindung anzupassen wird zum homogenisierten Lysat 70%-iger Ethanol hinzugefügt. Die Lösung wird durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gemischt.

Bindung der RNA an die NucleoSpin®

Für die Bindung der RNA wird eine NucleoSpin®-RNA-Säule verwendet und die vorbereitete Probenlösung auf die Säule gegeben. Nach der Zentrifugation wird das Collection Tube verworfen und die Säule mit gebundenen RNA in einem neuen Collection Tube platziert um eventuelle Kontaminationen zu vermeiden.

Entsalzen der Silika-Membran

Die Silika-Membran, an welche die RNA gebunden vorliegt, muss entsalzt und die RNA gereinigt werden. Dafür wird Membran-Entsalzungs-Puffer (Membrane Desalting Buffer, MDB-Buffer) auf die Säule gegeben, diese zentrifugiert und getrocknet (Trocken-Zentrifugation). Diese Salz Entfernung erfolgt um den sich anschließenden DNA-Verdau zu optimieren.

DNA-Verdau

Während des Isolations- und Aufreinigungsprozesses haben neben der RNA ebenfalls DNA-Bestandteile auf dem Säulenmaterial der NucleoSpin® gebunden. Die DNA wird durch Verdau mittels DNAsen (vorbereitete rDNase-Lösung) aus der Probenlösung entfernt. Dafür wird die vorbereitete Enzym-Reaktionslösung direkt auf die Silika-Membran der Säule gegeben und inkubiert.

Waschen und Trocknen der Silika-Membran

Für die Reinigung der Silika-Membran und der an ihr gebundenen RNA sind drei Waschschriffe notwendig. Für den ersten Waschschriff wird Waschpuffer „Buffer RAW2“ auf die RNA-Säule gegeben und zentrifugiert. Dieser Waschpuffer inaktiviert das Enzym DNase.

Im zweiten Waschschriff wird mit 96%-igem Ethanol versetzter RA3-Waschpuffer in die Reaktionsgefäße gegeben und zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen und die Säule zurück in dem Collection Tube platziert. Der Waschpuffer RA3 wird auf die Säule gegeben und zentrifugiert. Damit sollen die Waschpuffer-Reste des vorangegangenen Arbeitsschrittes herauswaschen werden. Dieser Waschschriff wird mit einem geringeren Volumen wiederholt. Während des letzten Zentrifugationsschrittes wird die Membran der Säule getrocknet.

Bei Berühren des Durchflusses durch die RNA-Säule, muss diese, nach dem Verwerfen des Durchflusses, erneut mit dem Collection Tube zentrifugiert werden. Dadurch wird eine Kontamination der RNA mit Waschpuffer und rDNAsen vermieden.

Elution der RNA

Die auf dem Trägermaterial der RNA-Säule gebundene RNA wird, durch Elution mit 60 µL vorgewärmtem Nuklease-freiem Wasser, von dieser heruntergewaschen. Die Erwärmung im Thermomixer und die 2-minütige Inkubation des Elutionsmediums auf der Säule optimiert den Prozess des Herunterlösens von der Säule (Elution). Nach der Zentrifugation liegt die RNA aufgereinigt vor.

Die Menge an RNA und deren Reinheit wird mit dem NanoDrop vermessen. Als Referenzwert (Blank-Wert) dient Nuklease-freies Wasser, in dem die RNA gelöst ist.

4.4.2 Reverse-Transkription – cDNA-Synthese

Das Umschreiben der RNA in cDNA (complementaryDNA) erfolgt mittels Reverser Transkription durch eine quantitative Reverse-Transkriptase-PCR (qRT-PCR) mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase. Es wird 1 µg RNA in die Reverse-Transkription eingesetzt. Der Master-Mix I wird nach den Angaben aus Tabelle 24 hergestellt.

Tabelle 24 Zusammensetzung von Master-Mix I für die Reverse Transkription

| Bestandteil | 1x-Ansatz |
|-----------------------------|------------------|
| dNTP (10 mM) | 1 µL |
| Poly-dT-Primer (10 pmol/µL) | 1 µL |

Für alle Proben, die in die Reverse Transkription eingesetzt werden, wird ein gemeinsamer Master-Mix (Master-Mix I) hergestellt. Zu den mit Wasser vorbereiteten RNA-Lösungen werden jeweils 2 µL des Master-Mix I hinzugegeben, sodass der erste Ansatz für die Reverse Transkription 12,5 µL umfasst. Die Ansätze werden für 10 Minuten bei 70 °C im ToChDown-Cycler inkubiert und im Anschluss im Eisbad denaturiert. Doppelsträngige Bereiche der RNA trennen sich während dieses Arbeitsschrittes auf, sodass die RNA vollständig einzelsträngig vorliegt und anschließend der poly-dT Primer binden kann. Die Proben werden kurz an zentrifugiert und auf Eis gelagert.

Es wird ein zweiter Master-Mix (Master-Mix II) nach den Angaben aus Tabelle 25 generiert (ohne Zugabe des Enzyms Reverse Transkriptase – SUPERScript II).

Tabelle 25 Zusammensetzung von Master-Mix II für die Reverse Transkription

| Bestandteil | 1x-Ansatz |
|----------------------------------|------------------|
| 5x First-Strand-Puffer (Gibco) | 4 µL |
| DTT (0,1 M) | 1 µL |
| RNAseOUT™ (40 U/µL) | 0,5 µL |
| H ₂ O | 1 µL |
| SUPERScript II (200 U/µL) | 1 µL |

Der Master-Mix II (ohne Enzym) wird für 5 Minuten bei 42°C im TouchDown-Cycler inkubiert und anschließend 1 µL des Enzyms Reverse Transkriptase SUPERScript II (1 µL/200 U pro 1x-Ansatz) hinzugefügt. Zu jeder der auf Eis stehenden vorbereiteten RNA-Proben werden 7,5 µL des Master Mix II (mit Enzym) zugegeben.

Die Ansätze werden im TouchDown-Cycler platziert und das folgende Programm durchgeführt:

Inkubation bei 42°C für 60 Minuten
Stoppen der Reaktion für 15 min bei 70°C.

Der Poly-dT-Primer lagert sich für die Amplifikation an den Poly-A-Schwanz der aus Zellen und Geweben isolierten und aufgereinigten mRNA an und die Reverse Transkriptase SUPERScript II führt das Umschreiben der RNA in eine cDNA durch. Das Reagenz DTT bewirkt die Denaturierung der RNA, sodass keine doppelsträngigen Bereiche entstehen, welche die Reverse Transkription behindern können. RNaseOUT bewirkt die Inhibierung von RNAsen, welche die RNA abbauen und die Ausbeute an cDNA dezimieren würden.

4.4.3 quantitative Real-Time-PCR (qPCR)

Für die Genexpressionsanalysen werden die cDNA-Proben (generiert mittels Reverser Transkription) in eine qPCR eingesetzt. Der PCR-Mix wird nach den Angaben aus Tabelle 26 hergestellt.

| Tabelle 26 Zusammensetzung qPCR für die Genexpressionsanalyse | |
|---|--------------|
| Bestandteil | 1x-Ansatz |
| PCR-Master-Mix (FastStart Universal der Firma Roche Diagnostics) | 12,5 µL |
| Primer CD8 oder GAPDH 3' for+rev (jeweils 5pmol/µL) | 2 µL |
| aqua dest. | 8,5 µL |
| Reaktionsvolumen | 23 µL |
| cDNA-Probe | 2 µL |
| Gesamtreaktionsvolumen | 25 µL |

Der Master-Mix wird zu je 23 µL (1x-Ansatz) auf 0,2 mL-PCR-Reaktionsgefäße aufgeteilt und je 2 µL cDNA-Probe zugegeben. Bei entsprechend großer Probenzahl werden die vorbereiteten PCR-Mixe in eine 96-Well-Platte gegeben und mit dem cDNA-Target versetzt.

Die Amplifikation erfolgt mit dem Real-Time-Gerät ABI7300 und wird nach dem Programm aus Abbildung 23 durchgeführt.

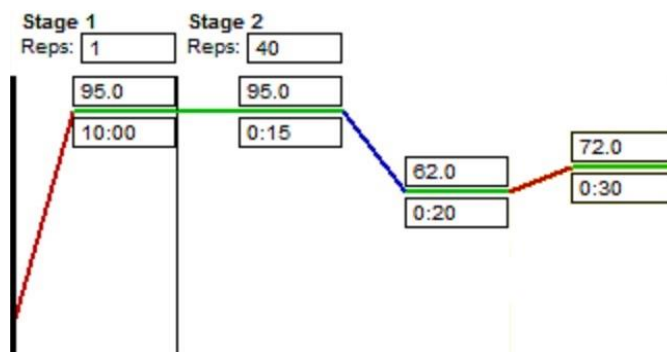


Abbildung 23 PCR-Programm qPCR (Genexpressionsanalyse)

Im Anschluss wird eine Schmelzkurve nach den Programm-Angaben aus Abbildung 24 erstellt.

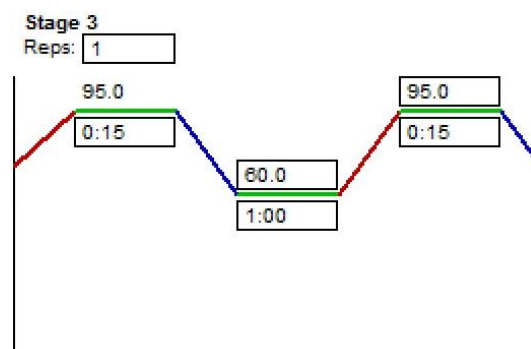


Abbildung 24 Schmelzkurven-Programm (Genexpressionsanalyse)

Die Daten aus quantitativer Real-Time-PCR und Schmelzkurve werden mit der Software Applied Biosystems Sequence Detection Software Version 1.2 (7300 System SDS software Core Application) ausgewertet.

Um die Ergebnisse aus der quantitativen Real-Time-PCR zu überprüfen werden die PCR-Produkte auf ein 2%-iges Agarosegel aufgetragen. Die Proben müssen dazu mit verdünntem Ladepuffer vorbereitet werden. Als DNA-Leiter (Standard) dienen 6 µL des Gene-Ruler 1 kb Plus. Die Proben laufen 30 Minuten bei 100 V, bis eine ausreichende Auftrennung der PCR-Produkte unter UV-Licht zu beobachten ist.

4.4.4 FACS-Analyse (FACS=Fluorescence-Activated-Cell-Sorting)

Die für die Genexpressionsanalyse als Kontrollen verwendeten CD8-positiven und CD8-negativen Zellen (T-Lymphozyten) werden aus Blut gewonnen. Aus diesen Zellen wird RNA isoliert, welche in cDNA umgeschrieben in die Genexpressionsanalyse eingesetzt wird.

In Vorbereitung auf die FACS-Analyse, das heißt die Sortierung der verschiedenen Lymphozyten-Arten, müssen diese von den restlichen Zellpopulationen aus menschlichem Blut isoliert werden.

Für die Lymphozyten-Isolation (und anderer kernhaltiger Zellen) wird peripheres Blut genutzt, dem ein Koagulationshemmer zugegeben wurde (Heparin). Die Isolierung der gewünschten Zellen erfolgt mithilfe der Ficoll-Hypaque-Dichtegradientenzentrifugation. Das Separationsmedium Ficoll-Paque™ Plus wird in eine Leucosep®-Röhrchen gegeben und zentrifugiert. In dem Röhrchen befindet sich eine poröse Trennscheibe aus biologisch inertem Polyethylen. Nach einer ersten Zentrifugation befindet sich das Separationsmedium unterhalb der Trennscheibe. Das antikoagulierte Blut wird durch Zugabe von DNase vorbereitet und zum Ficoll-Paque™ Plus in das Leucosep®-Röhrchen gegeben. Das Gemisch wird 15 min bei 2200 rpm und bei 20 °C zentrifugiert (Zentrifuge mit Ausschwingrotor ohne Bremse) und es ergibt sich folgende Schichtung von oben nach unten: Blutplasma, angereicherte Zellfraktion (Interphase), Separationsmedium, Trennscheibe, Separationsmedium und Pellet (Erythrozyten und Granulozyten). Das Blut-Plasma (obere Phase) wird abgenommen. Die Interphase in Form einer angereicherten Zellfraktion wird geerntet und eine Rekontamination, aus der Phase mit angereicherten Erythrozyten und Granulozyten, durch die Trennscheibe verhindert. Die Interphase mit den Lymphozyten wird in ein Spitzboden-Röhrchen gegeben, mehrmals mit PBS gewaschen und zentrifugiert (Zentrifugation mit Bremse). Das Zellpellet wird nach dem letzten Zentrifugationsschritt in PBS resuspendiert. Nach dieser Zentrifugation in der Ficoll-Lösung liegen die Lymphozyten getrennt von den anderen Zellen aus dem Blut vor.

Für die Gewinnung der CD8-positiven und CD8-negativen T-Lymphozyten aus der isolierten Lymphozyten-Lösung, wird die auf der Durchflusszytometrie basierende FACS-Analyse (Fluorescence-Activated-Cell-Sorting) angewendet. Dabei werden Zellen aus Blutproben spezifisch angefärbt, analysiert und sortiert. Das Verfahren ermöglicht die Sortierung lebender Zellen. [Herzenberg LA et al., Oktober 2002; Greiner bio-one]

Die Sortierung erfolgt nach spezifischer Bindung fluoreszenzmarkierter Antikörper an Oberflächen-Epitopen von beispielweise Immunzellen. Die Zellsuspension wird durch eine Düse gepresst, um Tropfen zu generieren, in denen jeweils nur eine Zelle enthalten ist. Diese Tröpfchen passieren einen Laserstrahl, der die Fluoreszenz der auf der Zelloberfläche gebundenen Antikörper anregt. Fluoreszenz und Streuung/Streulicht, die durch die Zelle entstehen, werden mittels eines Photomultipliers vermessen. Die Messwerte entscheiden über das Maß der Aufladung der Teilchen, was wiederum zu einer starken oder schwachen Ablenkung an geladenen Platten führt und einen Sortierungseffekt hat. [URL-46] Die Menge

des gestreuten Lichts korreliert mit Größe und Komplexität der Zelle. Die Streuung von Zellen mit einer rauen Oberfläche und vielen Vesikeln in ihrem Inneren ist höher, als die Streuung sehr glatter B- oder T-Zellen. Das Streulicht wird unterschieden in Vorwärtsstreulicht (FSC = Forward Scatter) und Seitwärtsstreulicht (SSC = Sidewards Scatter). FSC ist ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel und hängt vom Volumen der Zelle ab. SSC ist ein Maß für die Brechung des Lichts im rechten Winkel, die von der Granularität der Zelle, der Größe und Struktur ihres Zellkerns und der Menge der Vesikel in einer Zelle beeinflusst wird. [URL-47] Neben dem gestreuten Licht werden im Durchfluss-Zytometer Fluoreszenzfarben gemessen. Diese Bestimmung erfolgt nach Bindung eines Fluoreszenz-Antikörpers an bestimmten Oberflächenproteinen (z. B. Proteine der CD-Klassifizierung). Nach der Markierung erfolgt die Sortierung nach den Merkmalen des angeregten Fluoreszenzlichts, mithilfe dessen eine Sortierung nach den bestimmten Oberflächen- Merkmalen stattfindet. Über mehrere Schritte werden die T-Lymphozyten mit unterschiedlichen fluoreszierenden Antikörpern angefärbt und voneinander separiert um die gewünschten CD8-positiven bzw. CD8-negativen Zellen zu erhalten.

Die T-Lymphozyten für diese Arbeit werden durch eine CD3-CD45-CD8 Färbung und anschließende Analyse und Sortierung am BD Aria-II FACS (Inst. für Immunologie, Jena) gewonnen und in CD8-positive und CD8-negative T-Lymphozyten getrennt.

5 Ergebnisse

Die untersuchte Patienten-Kohorte weist ein heterogenes Erkrankungsbild auf, das heißt die Histologien der Patientinnen unterscheiden sich. 86% (42 von 49 Proben) der Gewebeproben sind seröse Ovarialkarzinome. Bei 14% (7 von 49 Proben) liegen endometrioide oder entdifferenzierte Histologien vor. Bei einer zu starken Homogenität des Patientenkollektivs können die generierten Ergebnisse ausschließlich auf den vorliegenden histologischen Typ angewendet werden und haben keine allgemeine Bedeutung für das Ovarialkarzinom. Die eingeschlossenen Patientinnen entstammen der Patientengruppe, die eine hohe p53-Mutationsrate und somit eine hohe Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von p53-Autoantikörpern aufweist (seröse und endometrioide OvCa).

78% der Patientinnen weisen Spätstadien > FIGO III auf. Das mediane Erkrankungsalter der untersuchten Patientinnen liegt bei 60 Jahren.

5.1 Immunhistochemie/Immunzytochemie

Den Ausgangspunkt für die Bachelorarbeit stellt die Praxismodulararbeit mit dem Thema „Analyse intratumoraler Immunzell-Populationen bei p53 AAK-positiven bzw. AAK-negativen Ovarialkarzinom-Patientinnen“ dar. In dieser Arbeit wurden die Bestimmung des AAK-Status und die immunhistochemische Anfärbung der Immunzell-Populationen dargelegt. Der AAK-Status bezüglich des Vorhandenseins von Autoantikörpern gegen das p53-Protein (positiv bzw. negativ) wurde in den Blutseren der Eierstockkrebs-Patientinnen mittels p53-Autoantikörper-ELISA bestimmt (Steinbeis-Transferzentrum für Angewandte Biologische Chemie, Mannheim, Deutschland). AAK-Status „negativ“ bedeutet, dass im Serum keine oder wenige Autoantikörper gegen p53 nachweisbar sind. Der p53-AAK-Titer liegt unter 120 U/ml. Proben mit dem AAK-Status „positiv“ besitzen einen p53-AAK-Titer, der höher als 120 U/ml liegt.

Für die spezifische Anfärbung von bestimmten Immunzellen in Gewebeproben von Ovarialkarzinom-Patientinnen wurde die Methode der Immunhistochemie genutzt. Die Experimente zur immunhistochemischen und immunzytochemischen Anfärbung wurden mittels verschiedener Primärantikörper etabliert. Diese Methode basiert auf dem spezifischen Binden des Primärantikörpers an die Antigene der verschiedenen Immunzell-Populationen. Mit Hilfe von Sekundärantikörpern, an denen das Enzym HRP konjugiert vorliegt, werden die Primärantikörper detektiert. Durch die Zugabe eines für das Enzym spezifischen Substrates kommt es zur Enzym-Substrat-Reaktion und zum Nachweis der Zellen.

Die endogenen Peroxidasen der Zellen können falsch positive Reaktionen durch Umsatz des Substrates hervorrufen. Zur Absättigung und Blockierung der endogenen Peroxidase-Enzyme werden die Gewebe mit H_2O_2 -Lösung behandelt. Dadurch werden die endogenen Peroxidasen abgesättigt und unspezifische Anfärbungen sollen vermieden werden.

In Vorbereitung auf die Anfärbung der klinischen Proben wurden verschiedene Tests durchgeführt. Um unspezifische Färbungen zu vermeiden wurden unterschiedliche H_2O_2 -Konzentrationen an Tonsillengewebe ausgetestet. Das Experiment ergab keine deutlichen Unterschiede in der Anzahl der falsch-positiven Zellen in der Negativkontrolle ohne Primärantikörper. Es wurden humane Krebszelllinien (SKOV3, Raji und KU812), welche in Form von Cell-Clots auf Objektträgern aufgebracht vorlagen, mit Antikörpern gefärbt. Damit wurde die Spezifität der verwendeten Primärantikörper bestätigt. Die regulatorische T-Zelllinie wurde immunzytochemisch und mittels Immunfluoreszenz (Sekundärantikörper mit Fluoreszenzfarbstoff markiert) mit einem Antikörper, der gegen das nukleäre Protein FoxP3 gerichtet ist, angefärbt.

Es wurden 46 Ovarialkarzinom-Gewebeproben immunhistochemisch angefärbt – T-Helferzellen mit dem CD4-Primärantikörper, zytotoxische T-Zellen mittels CD8-Primärantikörper, regulatorische T-Zellen mit dem FoxP3-Primärantikörper und B-Zellen mittels CD20-Primärantikörper. Um einen Überblick über die Morphologie der im Gewebe enthaltenen Zellen zu erhalten und unterschiedliche Gewebestrukturen zu differenzieren, wurde die Hämatoxylin-Eosin-Färbung genutzt. Die mit Hämatoxylin gefärbten Zellkerne erscheinen unter dem Mikroskop blau und das mit Eosin gefärbte Zytoplasma in unterschiedlichen rot-rosa-Abstufungen. Tumorareale und Stromabereiche innerhalb der untersuchten Gewebe können mit dieser Übersichtsfärbung besser differenziert werden.

Die angefärbten Gewebe sind unter dem Mikroskop (Zeiss Mikroskop Axioplan 2) von zwei unabhängigen Personen ausgewertet worden.

Für die Auswertung wurden die prozentualen Anteile an gefärbten Immunzellen (T-Helferzellen, zytotoxische T-Zellen, B-Zellen) im Tumorgewebe und im Stroma sowie die absoluten Häufigkeiten der gefärbten regulatorischen T-Zellen erfasst.

Die jeweils gefärbte Immunzellpopulation wurde nach ihrer Anzahl (getrennt für Tumorgewebe und Stroma) in zwei bzw. drei Gruppen eingeteilt und in diesen einzelnen Gruppen die zugehörigen Proben, nach AAK-positiv bzw. AAK-negativ differenziert, ausgezählt. Mittels geeigneter statistischer Tests wurde die Korrelation zwischen der vorliegenden Immunzellzahl und dem Autoantikörper-Status ausgewertet, d. h. die statistische Signifikanz bestimmt.

Als Ergebnis konnte, außer bei den zytotoxischen T-Zellen (CD8-Färbung), keine Korrelation der untersuchten Immunzellpopulationen (T-Helferzellen, regulatorische T-Zellen und B-Zellen) mit dem jeweils vorliegenden Autoantikörper-Status detektiert werden.

Die Anfärbung von Makrophagen mit dem CD14-Primärantikörper, brachte keine spezifischen Ergebnisse, da verschiedene, auch epitheliale Zellen, unspezifisch angefärbt wurden. Aus diesem Grund wurde ein Primärantikörper für das Protein CD163 gewählt, um die Immunzellpopulation der Makrophagen in den Proben zu charakterisieren.

5.1.1 Anfärbung von Tonsillengewebe

Tonsillen enthalten viele verschiedene Immunzell-Populationen. Um die Primärantikörper vor der eigentlichen Färbung der klinischen Gewebeproben zu testen, wurden diese an Tonsillengewebe getestet.

Tonsillen oder auch Mandeln genannt (siehe Abbildung 25) stellen Ansammlungen diffusen, knötchenförmigen lymphatischen Gewebes dar, welches in der Wand des Naso- und Oropharynx (Mundhöhle und Rachen) liegt. [URL-48] Sie gehören histologisch gesehen zum mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebe (MALT). [URL-49]

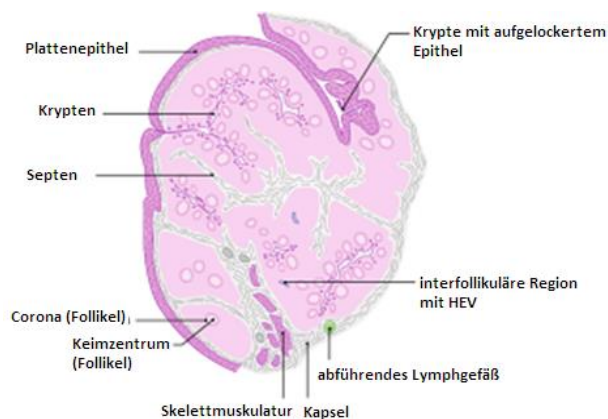


Abbildung 25 Schematischer Aufbau der Tonsilla palatina [Zilles & Tillmann, 2010]

Sie besitzen auf ihrer Oberfläche eine erhebliche Zahl an Vertiefungen (Krypten *Cryptae tonsilares*), welche die Funktion einer Oberflächen-Vergrößerung haben. [URL-49] [Zilles & Tillmann, 2010] Die engeren Einsenkungen des Epithels werden als Krypten bezeichnet und die weiteren Einsenkungen Buchten genannt. [Linß & Fanghänel, 1999] Die Gaumenmandel eines Erwachsenen erreicht auf diese Weise eine Oberfläche von 300 cm² (bei einer Schleimhautoberfläche von 50 cm²). Die Tonsillenoberfläche besitzt ein mehrschichtiges Plattenepithel, das viele der Krypten (Einstülpungen) enthält. Das darunterliegende Bindegewebe charakterisiert sich durch dichte Ansammlungen von Lymphfollikeln. [URL-48] [URL-49] Die innere Oberfläche ist durch schlecht organisierte

Kapseln charakterisiert, die durch Bindegewebssepten mit dem Parenchym verbunden sind. [URL-48]

Als Teil des Immunsystems und aufgrund ihrer Lokalisation am oberen Eingang des Verdauungs- und Respirationstrakts haben Tonsillen die Aufgabe Erreger, welche sich auf der Schleimhaut ausbreiten wollen, abzuwehren. [URL-48] [URL-49] Die Funktionen der Tonsillen umfassen die Antigen-Erkennung und die erste immunologische Abwehr durch Bildung immunokompetenter Zellen sowie die Antikörper-Sekretion. [Linß & Fanghänel, 1999] Das geschichtete Plattenepithel der Mundhöhle lockert sich in den Krypten in ein mehrreihiges Flimmerepithel (Rachen- und Tubenmandeln) auf. Das bildet die Grundlage für die Durchdringung des Epithels mit Lymphozyten (siehe Abbildung 26) und es wird der Kontakt zwischen Antigenen und Immunzellen erleichtert. [Zilles & Tillmann, 2010]

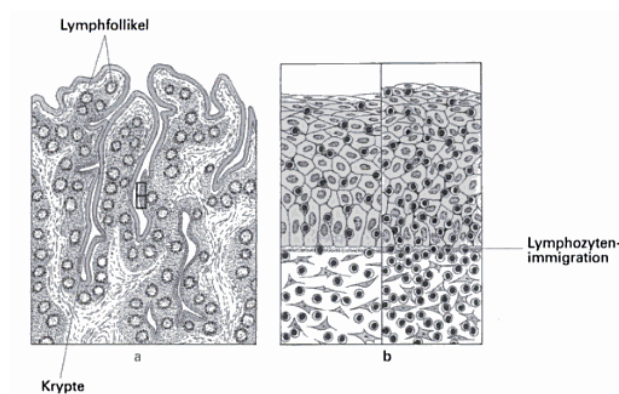


Abbildung 26 Gaumenmandel

a. Übersicht. tief hinunter reichende Krypten, die von Lymphozyten begleitet werden, teilweise sind Sekundärfollikel ausgebildet, b. Wanderung von Lymphozyten durch das Plattenepithel von einem Sekundärfollikel aus, b. rechte Seite: massive Durchsetzung des Epithels mit Lymphozyten, b. linke Seite: daneben beginnende Durchwanderung [Linß & Fanghänel, 1999]

Unterhalb des Epithels der Krypten befinden sich Follikel, welche hauptsächlich aus B-Lymphozyten bestehen und als B-Zone bezeichnet werden. Diese Follikel stellen Sekundärfollikel (B-Zellzone), bestehend aus Lymphozytenwall (Corona) und Keimzentrum, dar. Die interfollikulären Regionen, die zwischen den Follikeln liegen, weisen T-Lymphozyten und hochendotheliale Venulen (HEV) auf und bilden die T-Zone. [Zilles & Tillmann, 2010]

Der histophysiologisch entscheidende Ort des immunologischen Geschehens stellt der Grund der Krypten oder Buchten dar. An diesen Stellen (Durchwanderungszone) ist das Epithel stark aufgelockert und zum Teil durch massive Einwanderungen von Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen nicht mehr abgrenzbar und erkennbar. Am Kryptenfundus werden die Antigene von den Makrophagen aufgenommen, prozessiert und an immunkompetente Lymphozyten weitergeleitet. Diese Lymphozyten wandern in die Reaktionszentren der Sekundärfollikel,

proliferieren und bilden als Plasmazellen Antikörper gegen das Antigen. Die Plasmazellen besiedeln über den Blutweg Milz und Lymphknoten. [Linß & Fanghänel, 1999]

Über die T-Zellregionen treten die Lymphozyten in das Blut über. Die Rezirkulation der Lymphozyten wird durch postkapilläre Venulen realisiert, welche ein kubisches Endothel mit Leitfunktion für die Lymphozyten besitzen. Die Bindegewebskapsel der Tonsillen gehen in Septen über, in denen Blut- und Lymphgefäße liegen, welche in das Innere vordringen können und das Parenchym unterteilen. [Linß & Fanghänel, 1999]

Die Färbung des Tonsillengewebes mit dem CD8-Primärantikörper ist in Abbildung 27 dargestellt. Im Teil A der Abbildung ist die Färbung mit dem CD8-Primärantikörper dargestellt und Teil B repräsentiert die HE-Färbung. Die beiden aufgenommenen Ausschnitte aus dem Gewebe sind identisch. Die braun gefärbten CD8-positiven Zellen (zytotoxische T-Zellen) erstrecken sich in der T-Zone des Gewebes (2). Dagegen finden sich in der B-Zone (Sekundärfollikel) fast keine angefärbten zytotoxischen T-Zellen (1).

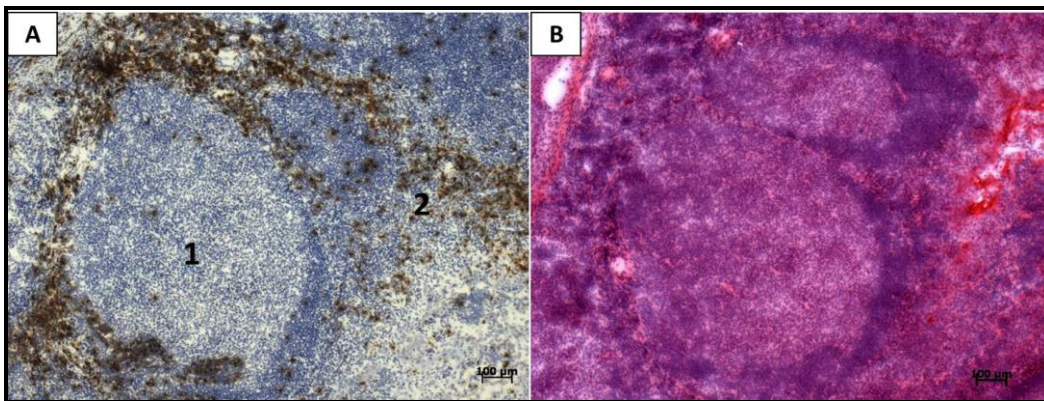


Abbildung 27 Färbung von Tonsillengewebe A CD8-Primärantikörper; B HE-Färbung
1 B-Zellzone, 2 T-Zellzone

Die Abbildung 28 stellt die Anfärbung des Tonsillengewebes mit dem für das CD20-Antigen spezifischen Primärantikörper dar. Dieser Antikörper färbt B-Zellen an. Die angefärbten Immunzellen konzentrieren sich auf die B-Zone (Sekundärfollikel) der Tonsille (1).

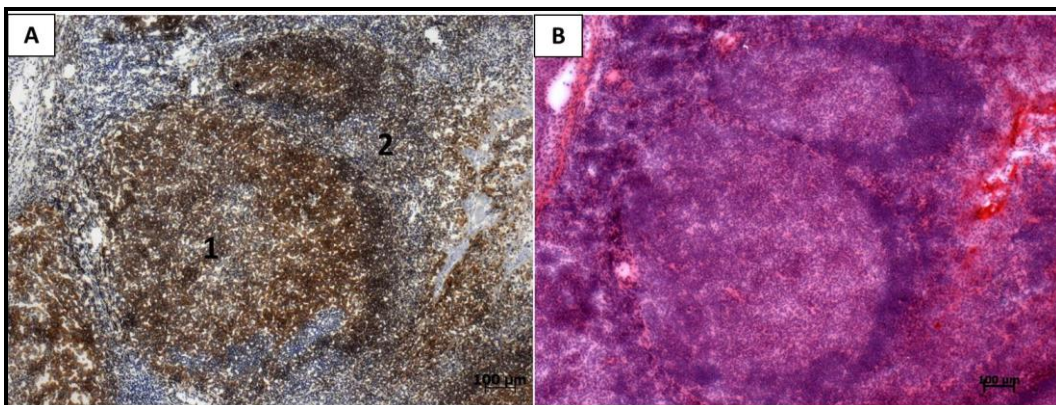


Abbildung 28 Färbung von Tonsillengewebe A CD20-Primärantikörper; B HE-Färbung
1 B-Zellzone, 2 T-Zellzone

Aus den beiden Färbungen (CD8 und CD20) gehen die beiden unterschiedlichen Bereiche der Tonsille hervor – T-Zellen in der interfollikulären Region (T-Zellzone) und B-Zellen in den Sekundärfollikeln (B-Zellzone).

Aus den Färbungen wird eine hohe Spezifität der genutzten Primärantikörper für die jeweilige Immunzell-Population abgeleitet.

5.1.1 Anfärbung von zytotoxischen T-Zellen mit dem CD8-Primärantikörper

Ausschnitte von drei Ovarialkarzinom-Gewebeproben, die mit dem CD8-Primärantikörper gefärbt wurden, sind in Abbildung 29 dargestellt.

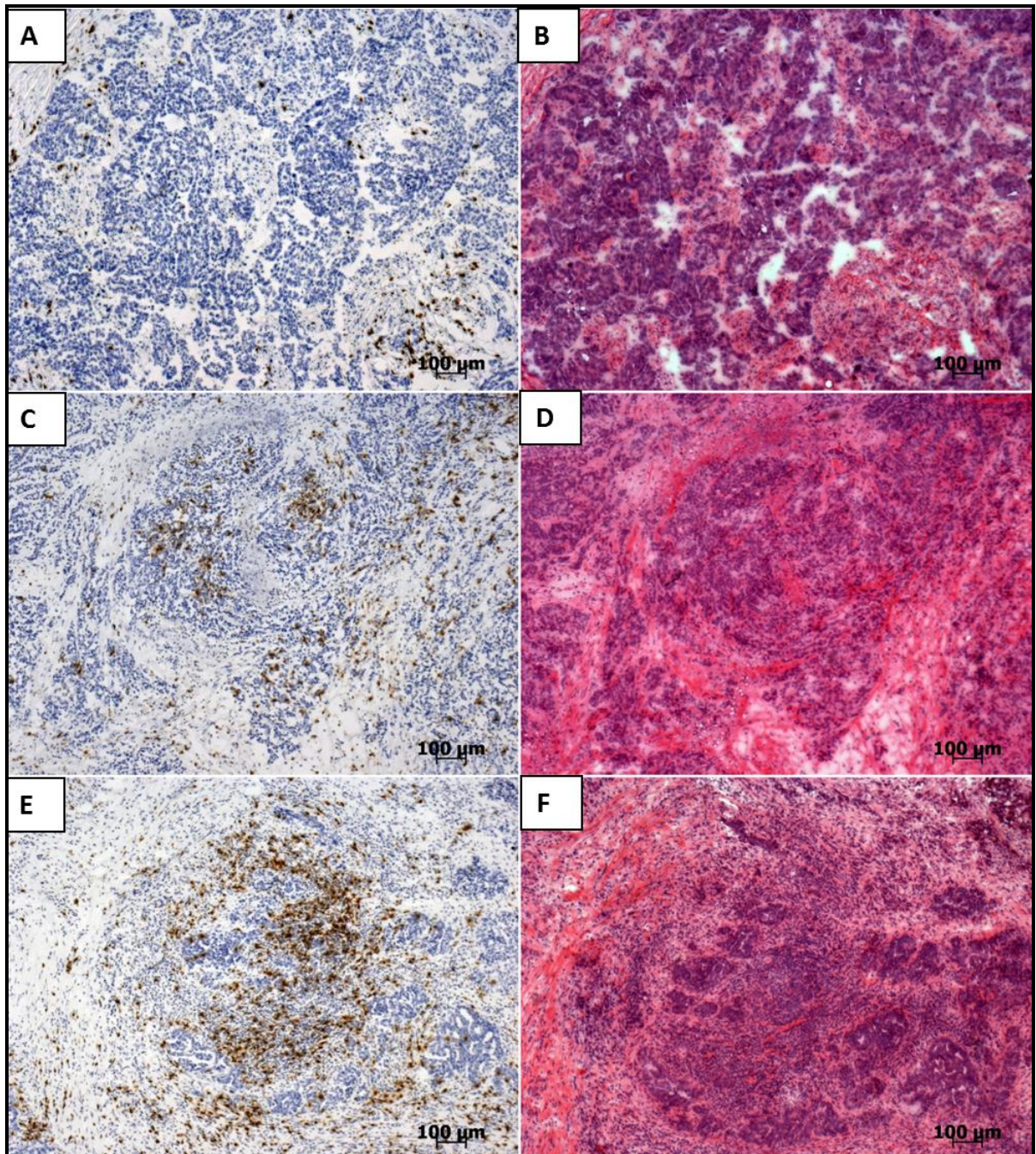


Abbildung 29 CD8- und HE-Färbung von drei OvCa-Gewebeproben:

A wenige Immunzellen gefärbt ($\leq 0,1\%$); B mittlere Anzahl an Immunzellen gefärbt (1%); C viele Immunzellen gefärbt ($> 1\%$)

In dieser Abbildung sind drei Gewebeproben mit deren zugehörigen HE-Färbungen zu sehen. In den Geweben sind wenige Immunzellen (A), mittelmäßig viele Immunzellen (C) und viele Immunzellen (E) angefärbt.

Nach der Anfärbung der Gewebe mit einem Primärantikörper der gegen das CD8-Antigen (zytotoxische T-Zellen) gerichtet ist, wurden die prozentualen Häufigkeiten der angefärbten Immunzellen in den einzelnen Geweben, differenziert nach Tumor- und Stromagewebe, bestimmt.

Der Zusammenhang zwischen Immunzellzahl und AAK-Status wurde basierend auf statistischen Testverfahren bestimmt – Chi²-Test und Fisher's Exact Test.

Der Chi²-Test ermittelt, angewendet auf Kreuztabellen, die Wahrscheinlichkeit, dass ein Zusammenhang nicht zufällig auftritt, sondern gleich verteilt vorliegt. Eine Kreuztabelle dient dazu, die kombinierte Häufigkeitsverteilung zweier Variablen (AAK-Status und Zellzahl) darzustellen. Das heißt es werden Fallgruppen (Zell-Gruppen) betrachtet, die durch die Kombination der Merkmale aus den beiden Variablen AAK-Status und Anzahl gefärbter CD163-Zellen definiert sind. Der Chi²-Test überprüft, ob zwei Variablen vollkommen unabhängig voneinander verteilt sind oder ob ein Zusammenhang zwischen den Variablen besteht. Zur Durchführung des Signifikanztests wird das Prüfmaß Chi-Quadrat berechnet.

Der Test berechnet die Abweichungen der beobachteten (ausgezählten) Häufigkeiten von den erwarteten (berechneten) Häufigkeiten und drückt diese Differenz in einer Zahl aus. Je grösser diese Abweichung ist, desto höher fällt der Chi²-Wert aus. Existiert keine Differenz, ist Chi² sehr klein. Die erwartete Häufigkeit berechnet sich nach dem Multiplikationssatz der Wahrscheinlichkeitstheorie für unabhängige Ereignisse $P(A \cap B) = P(A) * P(B)$.

Die kritische Größe des Chi²-Tests (asymptotische Signifikanz) wird mit der Wahrscheinlichkeit p kleiner als 0,05 ausgedrückt. Die Abweichung zwischen beobachteter und erwarteter Wahrscheinlichkeit ist im Bereich des kritischen Chi²-Wertes ($p < 0,05$) so groß, dass keine normale, zufällige Streuung existiert. Um zu entscheiden, ob der Chi²-Wert groß genug ist und die beobachtete Abweichung statistisch signifikant ist, wird der p -Wert der asymptotischen Signifikanz herangezogen. Die Nullhypothese H_0 besagt, dass die beiden getesteten Parameter anhand ihrer Proportionen gleich sind. Das heißt, zwischen den beiden Parametern liegt eine Korrelation vor.

Der Fisher's Exact Test stellt eine direkte Wahrscheinlichkeit (p -Wert) für das Zutreffen der Nullhypothese dar. Die Nullhypothese (H_0) besagt, dass es keinen statistischen Zusammenhang zwischen den getesteten Größen gibt. Der Fisher's Exact-Test gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der die Immunzellzahl und der AAK-Status nicht korrelieren.

Auswertung in Excel

Die Daten zu den Immunzellen (im Tumor- bzw. Stromabereich der Gewebeproben) wurden neben dem AAK-Status in einer Excel-Tabelle erfasst. Das Auftreten der Immunzell-Zahlen wurde über das gesamte Probenset in zwei Gruppen eingeteilt. Als Trenngröße für die Immunzellzahlen im Tumor diente die prozentuale Häufigkeit von 1% und im Stroma die prozentuale Häufigkeit von 10 %. Die Tabelle 27 gibt die Einteilungskriterien der erfassten Daten an.

Tabelle 27 Einteilung der ermittelten Daten in zwei Gruppen (M=Median der 47 Proben)

| | CD8 in % | |
|----------|----------|-----------|
| | Tumor | Stroma |
| Gruppe 1 | ≥ 1 | ≥ 10 |
| Gruppe 2 | < 1 | < 10 |

Die Anzahl der Datenwerte in den einzelnen Gruppen wurde ausgezählt und nach AAK-positiven und AAK-negativen Gewebeproben unterschieden. Die ermittelten Werte wurden in einer Kreuztabelle angeordnet (siehe Tabelle 28).

Tabelle 28 CD8-positive Zellen (Tumor) gruppiert nach AAK+/AAK-
CD8-positive Zellen im Tumorgewebe

| | | $\geq 1\%$ | $< 1\%$ | |
|------------|---|------------|---------|----|
| AAK-Status | + | 16 | 1 | 17 |
| | - | 14 | 15 | 29 |
| | | 30 | 16 | 46 |

Um einen Zusammenhang zwischen dem AAK-Status und der Zahl CD8-positiver Immunzellen zu ermitteln, wurden der χ^2 -Test und der Fisher's Exact Test in Excel angewendet (siehe Tabelle 29). Die beiden Parameter AAK-Status und Immunzellzahl wurden auf eine Korrelation und einer statistischen Signifikanz hin geprüft.

Tabelle 29 χ^2 -Test und Fisher's Exact Test

| | CD8 (Tumor) | CD8 (Stroma) |
|-------------------------|-------------|--------------|
| p (χ^2) | $< 0,005$ | $> 0,05$ |
| P (Fisher's Exact Test) | 0,00155554 | 0,07217038 |

Die Prüfgröße des χ^2 -Tests für den Zusammenhang zwischen der Anzahl CD8-positiver Immunzellen im Tumorgewebe und AAK-Status liegt bei 9,929 und damit unterhalb der kritischen Grenze für $\alpha = 0,05$. Der getestete Zusammenhang ist hoch-signifikant, da die Prüfgröße für den χ^2 -Test einen p-Wert unter 1% ($< 0,01$) annimmt. Die Wahrscheinlichkeit eines Zusammenhangs ist größer als 99 %. Das bedeutet es besteht ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen CD8-positiven Immunzellen innerhalb des Tumorgewebes einer

Ovarialkarzinomprobe und dem bei diesen Patientinnen vorliegenden AAK-Status. Die Nullhypothese (H_0 : Die getesteten Größen sind statistisch unabhängig.) kann abgelehnt werden. Mit einer Wahrscheinlichkeit von unter 0,5 % sind die beiden getesteten Größen (AAK-Status und CD8-positive Zellen im Tumorgewebe) statistisch unabhängig.

Der Ergebniswert des Fisher's Exact Tests ist eine direkte Wahrscheinlichkeit (p-Wert) für das Zutreffen der Nullhypothese. Die Nullhypothese (H_0) besagt, dass es keinen statistischen Zusammenhang zwischen den getesteten Größen gibt. Der Fisher's Exact-Test gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der die Immunzellzahl und der AAK-Status nicht korrelieren. Das bedeutet für CD8-positive Zellen im Tumor existiert mit einer Wahrscheinlichkeit p von 0,00156 (0,156 %) zwischen Immunzellzahl und AAK-Status keine Korrelation. Anders ausgedrückt trifft die Alternativhypothese mit einer 99%-igen Wahrscheinlichkeit zu und es gibt einen Zusammenhang zwischen AAK-Status und CD8-positiven Immunzellen im Tumorbereich der untersuchten Gewebe. Ausschließlich für CD8-positive Zellen (zytotoxische T-Zellen) im Tumor liegt der p-Wert für die Prüfgröße des χ^2 -Tests unter $\alpha = 0,05$ und beweist die statistisch signifikante Korrelation (siehe Tabelle 29 grün hinterlegte Spalte).

Auswertung in SPSS

Die Daten aus der immunhistochemischen Färbung der Gewebeproben wurden außerdem mittels SPSS (Statistik- und Analyse-Software der Firma IBM) ausgewertet. Die Einteilung der Daten nach den angefärbten Immunzellen erfolgte bei dieser Auswertung in drei Gruppen (siehe Tabelle 30).

Tabelle 30 Einteilung der ermittelten Daten in drei Gruppen

| | CD8 in % | |
|-----------------|------------|-----------|
| | Tumor | Stroma |
| Gruppe 1 | $\leq 0,1$ | 0,1 - 2,5 |
| Gruppe 2 | 1 | 3 - 15 |
| Gruppe 3 | > 1 | 20 - 40 |

Die Datenwerte wurden nach AAK-Status differenziert in den einzelnen Gruppen gezählt und die generierten Zahlen in Kreuztabellen angeordnet in SPSS ausgewertet. Die Anwendung des statistischen χ^2 -Tests brachte das gleiche Ergebnis hervor wie die Differenzierung in zwei Datengruppen und deren Auswertung in Excel. Es besteht ein statistischer Zusammenhang zwischen AAK-Status und der Immunzellzahl bei CD8-positiven Zellen im Tumorgewebe der untersuchten Ovarialkarzinom-Patientinnen.

CD8-positive Zellen, die im Tumorgewebe auftreten, korrelieren mit dem AAK-Status, da anhand der statistischen Auswertung eine hohe Signifikanz zu erkennen ist (α -Wert für die

Prüfgröße $\chi^2 < 0,05$). Die Wahrscheinlichkeit (Fisher's Exact Test) gibt an, dass zu unter 5 % - genauer gesagt mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,156 % - kein statistischer Zusammenhang für die Immunzellzahl CD8-positiver Zellen im Tumorgewebe und dem AAK-Status vorliegt. CD8-positive Zellen im Stroma sowie die weiteren untersuchten Immunzell-Populationen inner- und außerhalb der Tumorzellbereiche (in den untersuchten Geweben) zeigten keine statistisch signifikanten Werte für die Korrelation zwischen AAK-Status und Immunzellzahl auf.

5.1.2 Anfärbung von Makrophagen mit dem CD163-Primärantikörper

In den angefärbten Geweben wurde die Anzahl an CD163-positiven Zellen im Tumorgewebe und im Stroma unter dem Mikroskop prozentual bestimmt. Der Zusammenhang zwischen der Anzahl gefärbter Immunzellen im Tumor- bzw. Stromabereich und dem AAK-Status wurde auf Grundlage des χ^2 -Tests und des Fisher's Exact Tests bestimmt.

Auswertung in Excel

Die Datenwerte wurden in einer Excel-Tabelle zusammengefasst und für das Tumorgewebe nach der Trenngröße 1% (≥ 1 , < 1 sowie ≤ 1 , > 1) sowie für das Stromagewebe für die Trenngröße 25% (≤ 25 , > 25) in zwei Gruppen eingeteilt. Die Gruppierungsparameter sind in Tabelle 31 dargestellt.

Tabelle 31 Gruppierungsparameter 1 und 2 (Auswertung CD163-Färbung)

| | Gruppierungsparameter 1 CD163 in % | | Gruppierungsparameter 2 CD163 in % | |
|----------|---------------------------------------|-----------|---------------------------------------|-----------|
| | Tumor | Stroma | Tumor | Stroma |
| Gruppe 1 | < 1 | ≤ 25 | ≤ 1 | ≤ 25 |
| Gruppe 2 | ≥ 1 | > 25 | > 1 | > 25 |

Es wurden zwei verschiedene Einteilungen der Daten aus der CD163-Färbung (Tumor) herangezogen, da sich die Immunzellzahlen nicht in einigermaßen gleich große Datengruppen einteilen ließen. Die Zerlegung des Probensets in gleich starke Gruppen (nach der Anzahl an bestimmten gefärbten Immunzellen) hätte zur Folge gehabt, dass gleiche Datenwerte (in der Gruppe: 1% der Zellen im Tumorbereich gefärbt) getrennt worden wäre. Diese Verfahrensweise ist auswertungstechnisch ungünstig, weil eine Gruppe von Daten mit identischen Werten willkürlich getrennt in unterschiedlichen Gruppen dargestellt werden würde.

Die Fälle in den einzelnen Gruppen hat man ausgezählt und die Werte nach AAK-positiven und AAK-negativen Gewebeproben differenziert in einer Kreuztabelle angeordnet. Die Anordnung

der ausgezählten Datenwerte nach der Differenzierung auf Grundlage des Gruppierungsparameters 1 (im Tumorbereich) ist in Tabelle 32 dargestellt.

Tabelle 32 CD163-positive Zellen (Tumor) gruppiert nach AAK+/AAK-

| CD163-positive Zellen im Tumorgewebe | | | |
|--------------------------------------|---|-----------|-----------|
| AAK-Status | | < 1 % | ≥ 1 % |
| | + | 4 | 13 |
| | - | 11 | 18 |
| | | 15 | 31 |
| | | | 46 |

Tabelle 33 stellt die Anordnung der ausgezählten Werte nach dem Gruppierungsparameter 2 (im Tumorbereich) dar.

Tabelle 33 CD163-positive Zellen (Tumor) gruppiert nach AAK+/AAK-

| CD8-positive Zellen im Tumorgewebe | | | |
|------------------------------------|---|-----------|-----------|
| AAK-Status | | ≤ 1 % | > 1 % |
| | + | 10 | 7 |
| | - | 21 | 8 |
| | | 31 | 15 |
| | | | 46 |

Die Anordnung der bestimmten Werte für den Stromabereich ist in Tabelle 34 angegeben.

Tabelle 34 CD163-positive Zellen (Stroma) gruppiert nach AAK+/AAK-

| CD163-positive Zellen im Stromagewebe | | | |
|---------------------------------------|---|-----------|-----------|
| AAK-Status | | ≥ 1 % | < 1 % |
| | + | 16 | 1 |
| | - | 14 | 15 |
| | | 30 | 16 |
| | | | 46 |

Um einen Zusammenhang zwischen dem AAK-Status und der Immunzellzahl für die Immunzell-Population der Makrophagen im Tumor- bzw. Stromaareal nachzuweisen, wurden die erhaltenen Daten mit Hilfe des Chi²-Tests und des Fisher's Exact Tests in Excel ausgewertet (siehe Tabelle 35).

Die Nullhypothese H_0 für den Chi²-Test besagt, dass die Verteilung der AAK-Status bei den einzelnen Zellzahl-Gruppen (CD163-positive Zellen) anhand deren Proportionen gleich ist. Das heißt H_0 sagt aus, dass zwischen den beiden Parametern AAK-Status und CD163-positiven Zellen liegt eine Korrelation vorliegt.

Die Prüfgröße des Chi²-Tests für den Zusammenhang zwischen Immunzellzahl (CD163) und AAK-Status im Tumorbereich liegt für den Gruppierungsparameter 1 bei 1,012 und damit oberhalb der kritischen Grenze für $\alpha = 0,05$. Der p-Wert ist für die ermittelte Prüfgröße größer als 0,1 ($\alpha > 0,1$). Der getestete Zusammenhang ist nicht signifikant, da die Prüfgröße für den Chi²-Test einen p-Wert größer als 0,05 ergibt.

Für den Gruppierungsparameter 2 liegt die Prüfgröße des Chi²-Tests für den getesteten Zusammenhang zwischen Immunzellzahl (CD163) und AAK-Status im Tumoreal bei 0,901 und in der Folge über der kritischen Grenze von $\alpha = 0,05$. Der p-Wert verhält sich für die bestimmte Prüfgröße des Chi²-Tests größer als 0,1 ($\alpha > 0,1$). Auch hier ist keine statistische Signifikanz zwischen den beiden geprüften Parametern erkennbar.

Im Stroma liegt die Prüfgröße des Chi²-Tests für den Zusammenhang zwischen Immunzellzahl (CD163) und AAK-Status bei 0,093 und damit oberhalb der kritischen Grenze für $\alpha = 0,05$ ($\alpha > 0,1$). Es ist kein statistischer Zusammenhang zwischen den beiden Prüfgrößen Immunzellzahl und AAK-Status gegeben.

Das bedeutet der getestete Zusammenhang zwischen CD163-positiven Immunzellen innerhalb und außerhalb der Tumorbereiche und dem AAK-Status ist statistisch nicht signifikant. Die Nullhypothese (H_0 : Die getesteten Größen sind statistisch unabhängig.) muss zugestimmt werden. Mit einer Wahrscheinlichkeit von unter 5 % sind die beiden getesteten Größen (AAK-Status und CD8-positive Zellen im Tumorgewebe) statistisch abhängig.

Der Wert für den Fisher's Exact Test ist ein p-Wert, der die Wahrscheinlichkeit, mit der die Nullhypothese zutrifft, direkt angibt (siehe Tabelle 35). Die Nullhypothese (H_0) besagt, dass es keinen statistischen Zusammenhang zwischen den getesteten Größen gibt, das heißt, dass Immunzellzahl und AAK-Status nicht korrelieren. Das bedeutet für CD163-positive Zellen im Tumor korrelieren Immunzellzahl und AAK-Status mit einer Wahrscheinlichkeit p von 35,2 % bzw. 51,56 % nicht. CD163-positive Zellen im Stroma korrelieren mit dem AAK-Status mit einer Wahrscheinlichkeit p von 100 % nicht.

Tabelle 35 Chi²-Test und Fisher's Exact Test für CD163-positive Zellen

| | CD163 (Tumor) | CD163 (Stroma) |
|--------------------------------|--|-----------------------|
| p (Chi²) | > 0,05 | > 0,05 |
| P (Fisher's Exact Test) | 0,3524723 (Gruppierungsparameter 1) 0,5155899 (Gruppierungsparameter 2) | 1 |

Auswertung mittels SPSS

Die Daten aus der Immunhistochemie wurden außerdem mittels SPSS (Statistik- und Analyse-Software der Firma IBM) ausgewertet. Die Einteilung der Daten nach den angefärbten Immunzellen erfolgte bei dieser Auswertung in drei Gruppen (siehe Tabelle 36).

Tabelle 36 Einteilung der ermittelten Daten in drei Gruppen

| | CD163 in % | |
|----------|------------|-------------|
| | Tumor | Stroma |
| Gruppe 1 | ≤ 1 | ≤ 15 |
| Gruppe 2 | 1 | 15 < x ≤ 30 |
| Gruppe 3 | > 1 | > 30 |

Die Proben der einzelnen Gruppen wurden nach dem AAK-Status differenziert gezählt und die ermittelten Zahlen in einer Kreuztabelle angeordnet in SPSS ausgewertet. Für den Tumorbereich der Gewebe wurden die ausgezählten Daten nach der Kreuztabelle (siehe Tabelle 37) angeordnet.

Tabelle 37 Kreuztabelle: Anzahl CD163-positiver im Tumoreal (Auswertung mittels SPSS)

| | | Spalten- Index | | | Gesamt |
|---------------|------|----------------|------|------|--------|
| | | 1,00 | 2,00 | 3,00 | |
| Zeilen- Index | 1,00 | 4 | 6 | 7 | 17 |
| | 2,00 | 11 | 10 | 8 | 29 |
| Gesamt | | 15 | 16 | 15 | 46 |

Der Zeilen-Index 1 gibt die Anzahl der AAK-positiven Werte in den einzelnen Gruppen (Spalten-Index 1-3) an. Der Zeilen-Index 2 repräsentiert die Zahl der AAK-negativen Werte.

Die Auswertung der Daten aus der Kreuztabelle für das Tumoreal ist in Tabelle 38 aufgeführt

Tabelle 38 Chi²-Test für Tumoreal (Auswertung mittels SPSS)

| | Wert | df | Asymptotisch e Signifikanz (2-seitig) |
|------------------------------------|--------------------|----|---|
| Chi-Quadrat nach Pearson | 1,291 ^a | 2 | ,524 |
| Likelihood-Quotient | 1,307 | 2 | ,520 |
| Zusammenhang linear- mit-linear | 1,260 | 1 | ,262 |
| Anzahl der gültigen Fälle | 46 | | |

In keiner der ausgewerteten Zellen liegt die erwartete Häufigkeit unterhalb der kritischen Grenze von 5. Die minimale erwartete Häufigkeit beträgt 5,54 (siehe Tabelle 38 Annotation a). Das Maß für die Abweichung zwischen erwarteter und beobachteter Häufigkeit liegt für den Tumorbereich bei einem Chi²-Wert von 1,291. Die kritische Größe des Chi²-Tests (asymptotische Signifikanz siehe Tabelle) wird mit der Wahrscheinlichkeit p kleiner als 0,05 ausgedrückt. Die asymptotische Signifikanz beträgt 0,524 und liegt oberhalb eines Wertes von 0,05. Das bedeutet, dass mit einer Wahrscheinlichkeit von mehr als 95 % (oder mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5 %) anzunehmen ist, dass kein Zusammenhang zwischen dem AAK-Status und der im Tumorbereich der Gewebe angefärbten CD163-positiven Zellen vorliegt. Die Abweichung zwischen beobachteter und erwarteter Häufigkeit ist statistisch nicht signifikant.

Die ausgezählten Daten des Stromabereichs wurden nach den Angaben aus Tabelle 39 sortiert.

Tabelle 39 Kreuztabelle: Anzahl CD163-positiver im Stromaareal (Auswertung mittels SPSS)

| | | Spalten- Index | | | Gesamt |
|---------------|------|----------------|------|------|--------|
| | | 1,00 | 2,00 | 3,00 | |
| Zeilen- Index | 1,00 | 2 | 8 | 7 | 17 |
| | 2,00 | 10 | 9 | 10 | 29 |
| Gesamt | | 12 | 17 | 17 | 46 |

Der Zeilen-Index 1 gibt die Anzahl der AAK-positiven Werte in den einzelnen Gruppen (Spalten-Index 1-3) an. Der Zeilen-Index 2 repräsentiert die Zahl der AAK-negativen Werte.

Die Auswertung der Daten der Kreuztabelle für das Stromaareal ist in Tabelle 40 aufgeführt.

Tabelle 40 Chi²-Test für Stromaareal (Auswertung mittels SPSS)

| | Wert | df | Asymptotisch e Signifikanz (2-seitig) |
|------------------------------------|--------------------|----|---|
| Chi-Quadrat nach Pearson | 2,995 ^a | 2 | ,224 |
| Likelihood-Quotient | 3,246 | 2 | ,197 |
| Zusammenhang linear- mit-linear | 1,466 | 1 | ,226 |
| Anzahl der gültigen Fälle | 46 | | |

In einer ausgewerteten Zelle ist die erwartete Häufigkeit kleiner als 5 und liegt bei 4,43 (siehe Tabelle 40 Annotation a). Daher ist der angewendete Test zur Auswertung des Zusammenhangs der beiden Parameter nur bedingt geeignet.

Das Maß für die Abweichung zwischen erwarteter und beobachteter Häufigkeit ergibt für den Stromabereich einen Chi²-Wert von 2,995. Die asymptotische Signifikanz für den Stromabereich liegt bei 0,224 und befindet sich oberhalb der kritischen Grenze von 0,05. Die Nullhypothese H_0 muss angenommen werden.

Ein *p*-Wert von < 0,05 bedeutet, dass die Nullhypothese nur so wahrscheinlich ist wie *p*, das heißt kleiner als 5%. Weil die Wahrscheinlichkeit, dass H_0 wahr ist einen so kleinen Wert angenommen hat, muss man die Nullhypothese H_0 verwerfen und auf die Alternativhypothese ausweichen. Die Korrelation zwischen AAK-Status und der im Stroma angefärbten CD163-positiven Zellen ist statistisch nicht signifikant.

Für die Einteilung der gefärbten prozentualen Zellzahl in drei Gruppen liegen weder für Tumor noch Stroma Zusammenhänge, zwischen dem AAK-Status und der Zahl gefärbter CD163-positiver Zellen, vor. Die Korrelationen sind jeweils statistisch nicht signifikant.

Die Einteilung der Daten in drei Gruppen und die Anwendung des statistischen Chi²-Tests ergab die gleichen Ergebnisse wie die Einteilung in zwei Datengruppen und deren Auswertung in Excel.

Es besteht kein statistischer Zusammenhang zwischen AAK-Status und der Immunzellzahl bei CD163-positiven Zellen im Tumor- und Stromagewebe der untersuchten Ovarialkarzinom-Patientinnen.

5.1.3 Immunzell-Verhältnisse (innerhalb der Population sowie zwischen den Populationen)

Die ausgezählten angefärbten Zellen der einzelnen Immunzell-Populationen werden gegeneinander in einem Punkt(XY)-Diagramm aufgetragen. Die Ergebnisse jeder einzelnen Population werden im Hinblick auf alle weiteren untersucht. Dabei wird untersucht, ob das Verhältnis von spezifischen Immunzellen im Zusammenhang mit dem Vorliegen eines der beiden AAK-Status (positiv bzw. negativ) steht. Die Immunzellpopulationen werden in ihrem quantitativen Auftreten untereinander verglichen. Diese Vergleiche wurden allerdings nur für die Tumorbereiche der Gewebe charakterisiert. In Abbildung 30 ist das Punkt-Diagramm dargestellt, welches das Verhältnis der zytotoxischen T-Zellen (CD8) zu den T-Helferzellen (CD4) im Hinblick auf den AAK-Status darstellt.

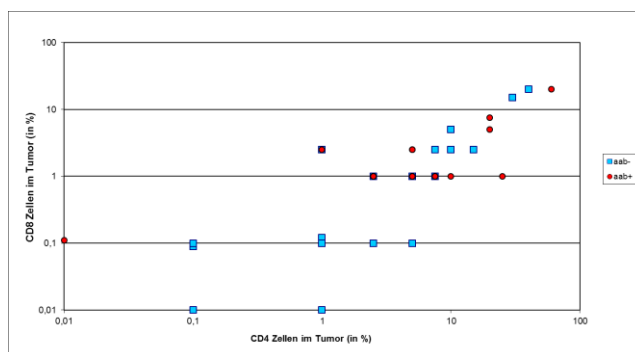


Abbildung 30 Punkt-Diagramm: Verhältnis zytotoxischer T-Zellen (CD8) zu T-Helferzellen (CD4) im Hinblick auf den AAK-Status

Die beiden Achsen repräsentieren die Zellzahlen und sind jeweils logarithmisch aufgeteilt. Die einzelnen Datenpunkte mussten teilweise auf die Darstellung angepasst werden, da die Punkte sonst übereinander liegen würden. Die beiden Datenreihen stellen die beiden AAK-Status dar. Die Daten für die AAK-positiven bzw. -negativen Punkte setzen sich aus den Immunzellzahlen der CD4-positiven Zellen (x-Achse) und der CD8-positiven Zellen (y-Achse) zusammen.

Für die AAK-negativen Proben ist kein genereller Trend für das Immunzell-Verhältnis CD8/CD4 erkennbar, da die Daten über das gesamte Zellzahl-Spektrum streuen. Für die AAK-positiven Werte ist ersichtlich, dass meist eine hohe Anzahl CD8-positiver Zellen gepaart mit vielen CD4-positiven Zellen auftreten (mit Ausnahme eines Ausreißers). Aber es zeigt sich kein Unterschied im Verhältnis CD4/CD8 zwischen den AAK+ bzw. AAK- Patientinnen.

Auch die weiteren Vergleiche der anderen Immunzell-Populationen untereinander erbrachten keine Zusammenhänge (CD4/FoxP3; CD4/CD163; CD4/CD20; CD8/FoxP3; CD8/CD163; CD8/CD20; FoxP3/CD163; FoxP3/CD20; CD163/CD20). Die Daten bezüglich des Vorkommens der jeweiligen Immunzell-Verhältnisse folgen bei den Patientinnen mit positivem bzw. negativem AAK-Status keinem generellen Trend. Aus dem gemeinsamen Auftreten von bestimmten Immunzellen in einer Gewebeprobe ist es nicht möglich auf den vorliegenden AAK-Status zu schließen. Die weiteren Ergebnisse (Diagramme) sind im Anhang dargestellt.

Ein weiterer Gesichtspunkt bei der Auswertung der Immunhistochemie-Daten ist die Verteilung der Zahlen angefärbter Immunzellen bei einer speziellen Immunzell-Population im Gewebe. Für jede einzelne Immunzell-Population wird die Anzahl der angefärbten Zellen über die gesamte Probenzahl analysiert (jeweils im Stroma- und Tumorbereich der Gewebe) und in Bezug zum auftretenden AAK-Status gesetzt. In Abbildung 31 ist das Punkt-Diagramm für die CD8-positiven Zellen im Tumor- und Stromabereich dargestellt.

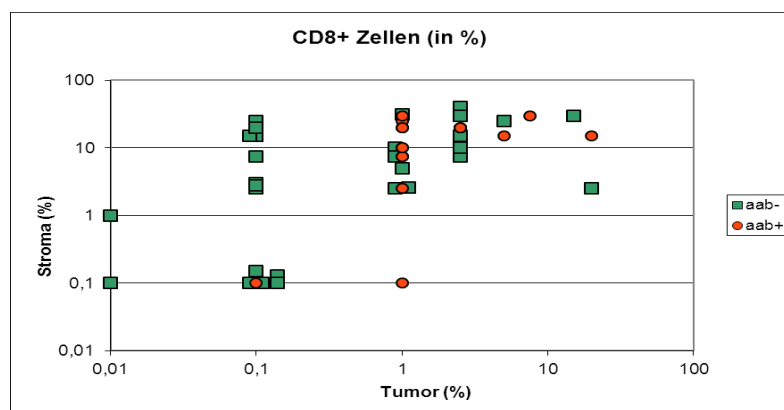


Abbildung 31 Punkt-Diagramm: Verhältnis zwischen zytotoxischen T-Zellen (CD8) innerhalb des Tumors und des Stromas im Hinblick auf den AAK-Status

Die Achsen des Diagramms stellen die Zahlen angefärbter Zellen, angegeben in %, in den Tumor- bzw. Stromabereichen dar. Die Achsen weisen eine logarithmische Einteilung auf. Es sind zwei Datenreihen dargestellt, welche den AAK-Status „positiv“ und „negativ“ repräsentieren. Die AAK-positiven bzw. -negativen Daten setzen sich aus den Immunzellzahlen der jeweiligen Gewebeproben im Tumor (x-Achse) und im Stroma (y-Achse) zusammen. Es ist kein genereller Unterschied in der Verteilung von Immunzellen im Stroma und im Tumor bei AAK-positiven oder AAK-negativen Geweben zu erkennen.

Die Analyse der weiteren Immunzellpopulationen ergaben Korrelationen zwischen dem Auftreten von Immunzellen im Tumor und im Stroma der Proben. Aber es gibt keine Unterschiede zwischen den Gruppen „AAK-positiv“ und „AAK-negativ“, bezüglich der Verteilungen angefärbter Immunzellen in Tumor- und Stromabereichen der Gewebeproben.

5.2 Validierung IHC-Daten – Methylierungsanalysen FoxP3-Genabschnitt

Die Daten aus der immunhistochemischen Färbung mit dem FoxP3-Primärantikörper wurden durch Methylierungsanalysen des FoxP3-Genabschnittes validiert. Die Immunhistochemie diente der Detektion der regulatorischen T-Zellen in den Gewebeproben. Die Zahl der angefärbten FoxP3-positiven Zellen war im Vergleich zu den Färbungen der T-Helferzellen mit CD4 sowie der regulatorischen T-Zellen mit CD8 sehr gering. Die regulatorischen T-Zellen wurden, nach der immunhistochemischen Färbung, auf DNA-Ebene mittels Methylierungsanalysen detektiert. Der Promotor des Gens, welches für das Erkennungsprotein FoxP3 (Erkennung der regulatorischen T-Zellen) kodiert, liegt in allen Zellen, außer regulatorischen T-Zellen methyliert („stillgelegt“) vor. Der Methylierungsgrad der Stroma- und Tumor-Zellen ist sehr hoch. In regulatorischen T-Zellen, liegt die DNA bezüglich des Promotorabschnittes des FoxP3-Gens unmethyliert vor. Der unmethylierte Promotor ermöglicht ein Ablesen des FoxP3-Gens während der Transkription und die Erzeugung des FoxP3-Proteins im Zellkern der regulatorischen T-Zellen.

Die Methylierungsanalysen bedürfen einer Positivkontrolle in Form eines Kontroll-Plasmids. Dieses enthält den gewünschten FoxP3-Genabschnitt, der mittels Klonierung in den Vektor eingebracht wurde. Das rekombinante Plasmid wurde mittels Transformation in *E. coli* vermehrt.

5.2.1 Sequenzierung der generierten Kontroll-Plasmide

Die mittels molekularbiologischer Methoden generierten Kontroll-Plasmide (FoxP3 1-1, FoxP3 2-1) wurden sequenziert um zu überprüfen ob das Insert ohne Sequenzfehler in das Plasmid eingebaut wurde. Die beiden Kontroll-Plasmide stammten aus zwei unterschiedlichen Transformationen und Selektionen. Die Ergebnisse der Sequenzierungen sind im Anhang dargestellt. Für eine Auswertung der Sequenzen wurde der Algorithmus BLAST (Basic Local Alignment Tool) herangezogen. Die Sequenz-Daten der Kontroll-Plasmide (kloniertes rekombinantes Plasmid) wurden mit der theoretischen Referenzsequenz (FoxP3-Genabschnitt) aligniert (verglichen) um die Sequenzunterschiede zu detektieren.

Das Insert ist im Kontroll-Plasmid FoxP3 1-1 vollständig mit identischer Sequenzabfolge vorhanden, sodass die Sequenzübereinstimmung zwischen rekombinantem Plasmid und Referenz bei 100% liegt. Beim Kontroll-Plasmid FoxP3 2-1 wurde ein Basen-Austausch im BLAST detektiert. Eine Guanin-Base in der Referenz liegt im klonierten Plasmid als Thymin vor, sodass die Übereinstimmung bei 99% liegt. Der Basen-Austausch befindet sich an Position 82,

wovon die Primerbindestellen für die MSP nicht betroffen sind. Dieses Ergebnis wurde auch vom Reverse-Primer bestätigt.

Die Inserts liegen vollständig und identisch zur Referenz in den jeweiligen Plasmid-Vektor kloniert vor. Mit Ausnahme eines eingeführten Basenaustauschs von Guanin nach Thymin an Position 82 des Klons FoxP3 2-1.

5.2.2 Restriktionsanalysen am generierten Kontroll-Plasmid

Die Überprüfung der in-vitro-Methylierung des Kontroll-Plasmids mithilfe des Restriktionsenzym NotI zeigte, dass das Plasmid unvollständig methyliert vorliegt.

Die generierten Kontroll-Plasmide wurden in der qRT-PCR mithilfe von methylierungs- und nicht-methylierungsspezifischen Primern amplifiziert. In die PCR wurden in-vitro methylierte und unmethylierte Plasmide eingesetzt. Um zu überprüfen ob die Methylierung der Kontroll-Plasmide erfolgreich war, wurde über einen erzeugten Sequenzunterschied (Bisulfitkonvertierung) die Sequenz methylierungsspezifisch geschnitten.

Die PCR-Produkte aus der methylierungs- bzw. nicht-methylierungsspezifischen PCR der methylierten und unmethylierten Plasmide (siehe Ergebnisse „methylierungsspezifische qRT-PCR an generierten Kontroll-Plasmiden“) wurden in den Restriktionsverdau mit TaqαI eingesetzt um die Bisulfitkonvertierung und in der Folge eine vorliegende Methylierung zu überprüfen. Die einzelnen Verdau-Ansätze wurden auf ein 2 %-iges Agarosegel aufgetragen (siehe Abbildung 32).

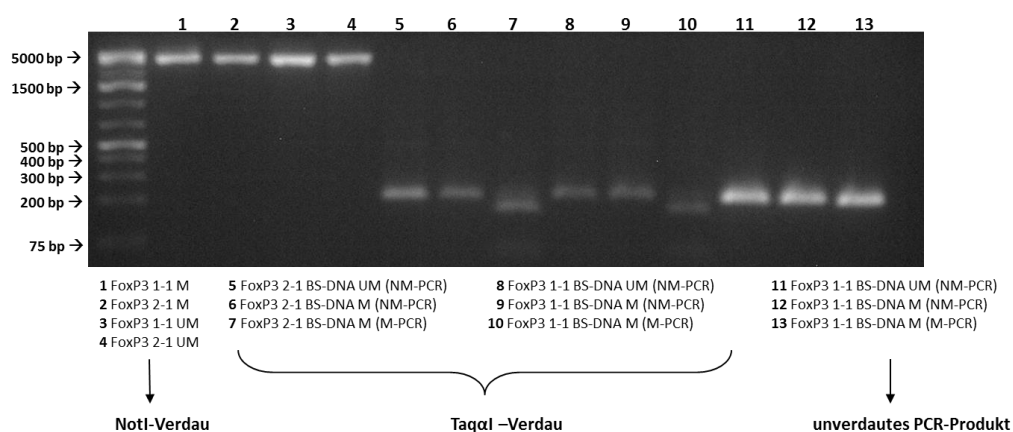


Abbildung 32 Agarose-Gelbild Restriktionsanalysen (Not I und Taq-alphaI)

In den ersten vier Geltaschen wurden die in-vitro methylierten Kontroll-Plasmide sowie deren unmethylierte Kontrollen aufgetragen. Diese Proben wurden mit dem Enzym NotI verdaut. In den Slots 5 bis 13 wurden die methylierten (M) bzw. unmethylierten (UM), Bisulfit-behandelten Kontroll-Plasmide (BS-DNA) aufgetragen, welche jeweils mit methylierungs- (M-PCR) bzw. nicht-methylierungsspezifischen Primern (NM-PCR) amplifiziert wurden.

In den folgenden Slots befinden sich die PCR-Produkte nach dem Verdau mit dem Enzym Taq α I (Slots 5 bis 10). In den letzten drei Slots wurden die unverdauten PCR-Produkte aus der qPCR gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Der Verdau mit NotI ergab, dass das Enzym die DNA geschnitten hat und die in-vitro-Methylierung nicht funktioniert hat. Die Phosphodiester-Bindung des zirkulären Plasmids wurde an der Erkennungsstelle durch das Enzym gespalten und die Plasmid-DNA liegt linear vor. Lineare DNA wandert aufgrund seiner höheren Behinderungen im Gel weniger weit als die zirkuläre DNA. Falls das Plasmid unverdaut vorliegt, liegen zwei oder mehr Banden im Gel vor. Diese Banden stellen die unterschiedlichen Konformationen des Plasmids (coiled, zirkulär, open circle) dar. Die unmethylierten Kontrollen wurden ebenfalls von dem Enzym geschnitten. Der Verdau mit Taq α I ergab nur eine teilweise Methylierung der Kontroll-Plasmide und auch eine spezifische Amplifikation durch die MSP. Das Enzym schneidet ausschließlich methylierte Cytosine, da diese nach der Bisulfit-Behandlung unverändert vorliegen. Unmethylierte Cytosin-Basen wurden durch die Behandlung mit Bisulfit in Uracil umgewandelt, wodurch die BS-DNA-Sequenz nicht mehr der Erkennungssequenz des Enzyms entspricht und diese nicht mehr schneidet. Die beiden methylierten Kontroll-Plasmide, welche mit methylierungsspezifischen Primern in der qPCR amplifiziert wurden (Slot 7 und 10) wurden fast vollständig von dem Enzym geschnitten. Im Vergleich dazu liegt bei dem unverdauten methylierten Plasmid (Kontrolle), welches mit methylierungsspezifischen Primern amplifiziert wurde (Slot 13), eine starke Bande vor. Das PCR-Produkt der NM-PCR wird sowohl ausgehend von unmethylierten Plasmiden, als auch von methylierten Plasmiden nicht verdaut (Slot 5, 6, 8, 9). Demzufolge amplifiziert die NM-PCR bei den methylierten Plasmiden nur die noch vorhandenen, durch die SssI-Methylase Behandlung nicht methylierten Moleküle und ist spezifisch für unmethylierte Fragmente. Aus dem Gelbild lässt sich schließen, dass die in-vitro-Methylierung an den Kontroll-Plasmiden nicht bei allen Plasmiden gleichermaßen funktioniert hat – zum Teil sind die Plasmide noch unmethyliert.

Aus diesem Grund wurden die Methylierungsansätze erneut methyliert (Zugabe des Enzyms Sss I Methylase und des Substrats SAM).

Die Ansätze wurden mit dem Enzym NotI verdaut und auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen (siehe Abbildung 33).

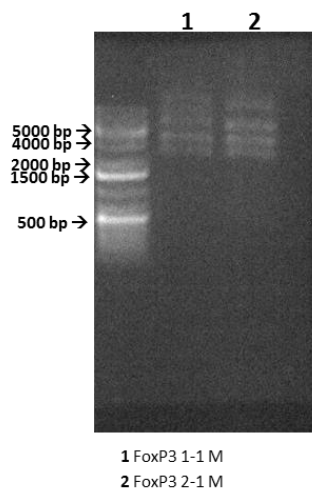


Abbildung 33 Agarose-Gelbild: 2-fach Methylierung Kontroll-Plasmide und Not I-Verdau

Der Verdau zeigte, dass die beiden Plasmide nicht verdaut wurden, da sich die verschiedenen Plasmid-Konformationen (zirkulär, coil, open circle) im Gel aufgetrennt haben. Das Plasmid liegt methyliert vor, da ein Verdau durch das Enzym an methylierten Plasmiden nicht möglich ist. Die PCR der in-vitro methylierten Plasmid-DNA ergab, dass auch bei diesen Plasmiden ein gewisser Anteil nicht methyliert wurde. In den folgenden Experimenten wurde die Abstrichprobe als Kontrolle für die Methylierungsanalyse etabliert.

Da die Kontroll-Plasmide nicht vollständig in-vitro methyliert wurden, nutzte man als Referenz für die Methylierungsanalyse Abstrich-DNA einer gesunden Patientin. Diese DNA verfügt bezüglich des untersuchten FoxP3-Genabschnitts über eine natürlicherweise vorkommende Methylierung. In dem Abstrich kommen epitheliale Zellen und keine regulatorischen T-Zellen vor, die eine Methylierung in dem spezifischen zu amplifizierenden Genabschnitt aufweisen. Durch eine zusätzliche in-vitro Methylierung wurde abgesichert, dass die CpG-Inseln in dem untersuchten genomischen Abschnitt methyliert vorliegen.

5.2.3 Etablierung von Methylierungsanalysen des FoxP3-Gens mittels MSP

Die Daten aus der immunhistochemischen Färbung der OvCa-Gewebe mittels des FoxP3-Primärantikörpers wurden mithilfe von Methylierungsanalysen an dem FoxP3-Genabschnitt validiert. Dafür wurde DNA aus den OvCa-Gewebe-Proben isoliert und in eine qPCR mit methylierungs- bzw. nicht-methylierungsspezifischen Primern eingesetzt. Vor dem Anwenden der Methode an den klinischen Proben, mussten einzelne Parameter der PCR an den eigens generierten Kontroll-Plasmiden validiert werden – die Primer-Spezifität, das Verhalten der Kontroll-Plasmide selbst, unterschiedliche Annealing-Temperaturen und verschiedene Primer-Konzentrationen.

Primer-Validierung – Überprüfung der Primer-Spezifität

Für die Primer-Validierung wurde die Spezifität der Primerpaare für die methylierungsspezifische Amplifikation und für die nicht-methylierungsspezifische Amplifikation überprüft. Dafür wurden kommerziell erworbene DNA-Proben der Firma Qiagen und vom Labor für Gynäkologische Molekularbiologie Jena generierte DNA-Proben verwendet. Das mittels MSP untersuchte Probenset ist in Tabelle 41 aufgelistet.

Tabelle 41 Methylierungsanalyse: Probenset für die Überprüfung der Primer-Spezifität

| Proben-Nr. | Probenbezeichnung |
|------------|---|
| 1 | unmethylierte menschliche reine DNA, 10 ng/μL (EpiTect® Firma Qiagen) |
| 2 | K6 reine DNA, 5 ng/μL |
| 3 | methylierte Bisulfit-behandelte menschliche DNA, 10 ng/μL (EpiTect® Firma Qiagen) |
| 4 | K6 methylierte Bisulfit-behandelte DNA, 5 ng/μL |
| 5 | unmethylierte Bisulfit-behandelte menschliche DNA, 10 ng/μL (EpiTect® Firma Qiagen) |
| 6 | K6 Bisulfit-behandelte DNA, 5 ng/μL |
| 7 | aqua dest. (Kontrolle) |

Die quantitative Real-time-PCR wurde an reiner unmethylierter DNA, methylierter Bisulfit-behandelter DNA und unmethylierter Bisulfit-behandelter DNA durchgeführt. Für die qPCR wurden der PCR-Mix FastStart Universal der Firma Roche Diagnostics und eine Annealing-Temperatur von 61 °C verwendet.

Die Ergebnisse aus der methylierungsspezifischen qPCR sind in Abbildung 34 dargestellt.

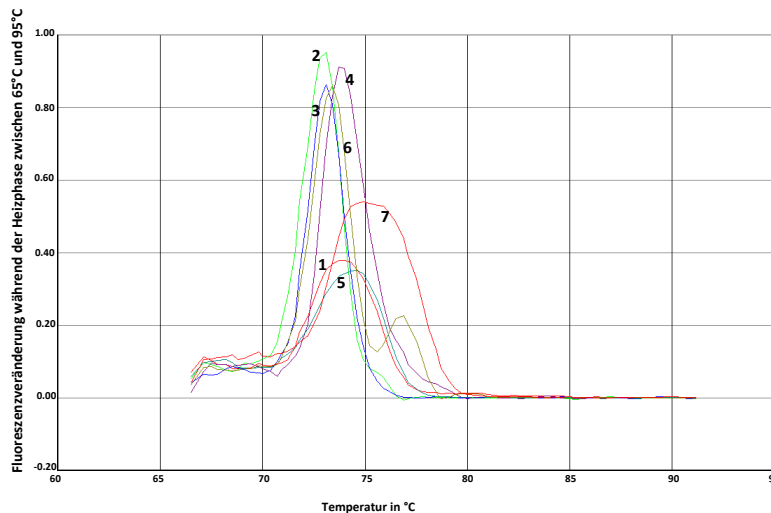


Abbildung 34 Methylierungsanalyse - Primer-Spezifität: Schmelzkurve M-qPCR:

1 unmethylierte menschliche reine DNA (UM), **2** K6 reine DNA (UM), **3** methylierte Bisulfit-behandelte menschliche DNA (M, BS-DNA), **4** K6 methylierte Bisulfit-behandelte DNA (M, BS-DNA), **5** unmethylierte Bisulfit-behandelte menschliche DNA (UM, BS-DNA), **6** K6 Bisulfit-behandelte DNA (UM, BS-DNA), **7** aqua dest. (Negativkontrolle)

Die Probe 1 (unmethylierte menschliche reine DNA) zeigte ausschließlich eine Amplifikation von Primer-Dimeren, deren Schmelzpunkt in etwa mit dem des spezifischen Produktes übereinstimmt (siehe Abbildung 36 Slot 1). Es wurde aber kein spezifische Produkt in der Probe amplifiziert. In Probe 2 (K6 reine DNA) wurde das spezifische Produkt amplifiziert, was vermutlich auf ein Vertauschen der Proben zurückzuführen ist, da das Ergebnis mit dem von Probe 1 übereinstimmen sollte.

Die Proben 3 und 4 (methylierte Bisulfit-behandelte menschliche DNA und K6 methylierte Bisulfit-behandelte DNA) stellen das spezifische Produkt dar, was außerdem aus dem Gelbild (siehe Abbildung 36) ersichtlich ist, da in Slot 3 und 4 eine starke Bande erkennbar ist. Diese stellt das spezifische Produkt dar.

In der unmethylierten Bisulfit-behandelten menschlichen DNA (Probe 5) wurden ausschließlich Primer-Dimere gebildet (siehe Slot 5 im Gelbild Abbildung 36) und es wurde kein spezifisches Produkt amplifiziert. Bei der Amplifikation der K6-DNA nach Bisulfit-Behandlung (Probe 6) wurde das spezifische Produkt gebildet (siehe Slot 6 im Gelbild Abbildung 36).

In der Wasserkontrolle (Probe 7) wurde kein spezifisches Produkt amplifiziert, sondern es haben sich ausschließlich Primer-Dimere gebildet. Primer-Dimere erscheinen in der Schmelzkurve im Gegensatz zum spezifischen Produkt meist als breitere und niedrigere Peaks.

Die Ergebnisse aus der nicht-methylierungsspezifischen qPCR sind in Abbildung 35 dargestellt.

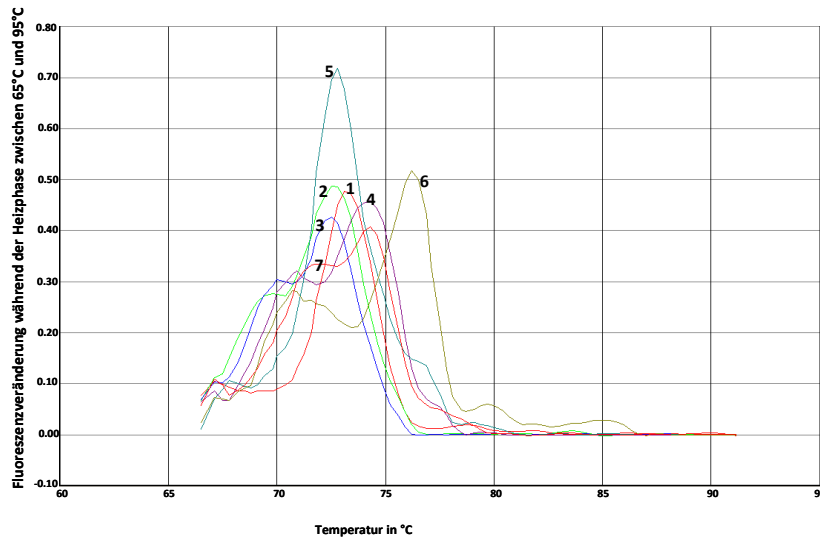


Abbildung 35 Methylierungsanalyse - Primer-Spezifität: Schmelzkurve NM-qPCR:

1 unmethylierte menschliche reine DNA (UM), **2** K6 reine DNA (UM), **3** methylierte Bisulfit-behandelte menschliche DNA (M, BS-DNA), **4** K6 methylierte Bisulfit-behandelte DNA (M, BS-DNA), **5** unmethylierte Bisulfit-behandelte menschliche DNA (UM, BS-DNA), **6** K6 Bisulfit-behandelte DNA (UM, BS-DNA), **7** aqua dest. (Negativkontrolle)

In den Proben 1 und 2 (menschliche reine DNA (UM) und K6 reine DNA (UM)) wurden nur Primer-Dimere amplifiziert, aber es ist kein spezifisches Produkt entstanden. Das Gelbild in Abbildung 36 zeigt diese Primer-Dimere in den Slots 8 und 9. Die methylierte Bisulfit-behandelte menschliche DNA (Probe 3) zeigt das spezifische Produkt (bei ungefähr 72 °C), aber es wurden vermehrt Primer-Dimere in der Probe gebildet. Im Gelbild bei Geltasche-Nr. 10 sind im Bild zwei Banden erkennbar – die obere Bande stellt eine geringe Menge an spezifischem Amplifikationsprodukt dar und die untere stärkere Bande (bei etwa 75 bp) sind die kürzeren unspezifischen Primer-Dimere. In der Probe K6 methylierte Bisulfit-behandelte DNA (Probe 4) wurden ausschließlich Primer-Dimere gebildet, was aus dem Gelbild (siehe Abbildung 36) ersichtlich ist. Aus der Schmelzkurve ist der große Peak (Probe 5, unmethylierte Bisulfit-behandelte menschliche DNA) erkennbar, welcher das spezifisch-amplifizierte Produkt darstellt. Das Ergebnis wird von den Daten aus dem Gelbild (Slot 12) bestätigt – die starke obere Bande repräsentiert das spezifische Produkt und die untere schwache Bande sind Primer-Dimere. Bei der K6 Bisulfit-behandelten menschlichen DNA (BS-DNA) wurde im Gegensatz zu dem kommerziell erworbenen Analogon kein spezifisches Produkt gebildet. Es haben sich während der PCR nur unterschiedlich große Primer-Dimere gebildet (siehe Gelbild Abbildung 36 Slot 13). Die Wasserkontrolle ist bis auf die entstandenen Primer-Dimere negativ (siehe Gelbild Abbildung 36 Slot 14).

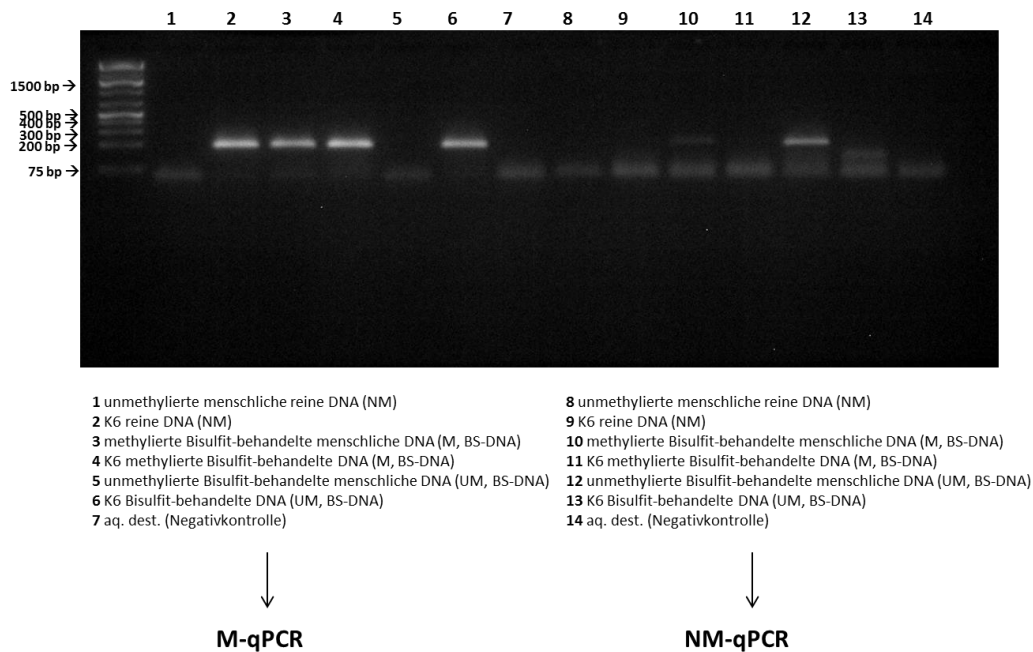


Abbildung 36 Agarose-Gelbild: Methylierungsanalyse - Primer-Spezifität

Die Daten aus der Schmelzkurve wurden durch die Daten aus der Gelelektrophorese bestätigt. Entstandene Primer-Dimere konnten durch den Auftrag auf ein 2%-iges Gel genauer charakterisiert werden.

Primer-Validierung – methylierungsspezifische qPCR an generierten Kontroll-Plasmiden

Für die weitere Validierung der Primer an den Kontroll-Plasmiden und die Überprüfung der Plasmid-Methylierung, wurden die beiden mittels Klonierung, Transformation und Bakterien-Kulturtechnik generierten Kontroll-Plasmide methyliert und Bisulfit-behandelt. Mithilfe der MSP wurden unter Verwendung methylierungs- und nicht-methylierungsspezifischer Primer unterschiedliche Konzentrationen der Kontroll-Plasmide ausgetestet. Die Bisulfit-behandelte Plasmid-DNA (BS-DNA), welche in die methylierungsspezifische qPCR eingesetzt wird, musste verdünnt werden um vergleichbar zu sein mit klinischen Proben. Diese Vergleichbarkeit ist notwendig, damit die Ergebnisse der ausgetesteten PCR-Parameter später auch an den klinischen Proben auswertbare Ergebnisse liefern.

Die verwendeten Proben sind in Tabelle 42 aufgeführt. Von methylierter und unmethylierter jeweils Bisulfit-behandelter Plasmid-DNA wurden zwei Verdünnungen hergestellt (1:100, 1:10000). Als Kontrollen dienten λ -DNA (50 ng/ μ L), Bisulfit-behandelte Abstrich-DNA (10 ng/ μ L), DNA aus HeLa-Zellen (10 ng/ μ L) und H₂O (Negativkontrolle). Die λ -DNA (450 ng/ μ L) wird in 10 mM Tris 1:9 verdünnt (50 μ L DNA + 400 μ L 10 mM Tris), um eine Arbeitskonzentration von 50 ng/ μ L zu erreichen.

Tabelle 42 Probenstet: Primer-Validierung – methylierungsspezifische qPCR an generierten Kontroll-Plasmiden

| Probenbezeichnung | Methylierungsstatus | Verdünnung | Kopie-Zahl/ Konzentration |
|---------------------------------|--------------------------------|-------------------|--------------------------------------|
| Plasmid-DNA: FoxP3 1-1 (BS-DNA) | methyliert | 1:100 | 90.000.000 |
| Plasmid-DNA: FoxP3 1-1 (BS-DNA) | methyliert | 1:10000 | 900.000 |
| Plasmid-DNA: FoxP3 1-1 (BS-DNA) | unmethyliert | 1:100 | 90.000.000 |
| Plasmid-DNA: FoxP3 1-1 (BS-DNA) | unmethyliert | 1:10000 | 900.000 |
| Plasmid-DNA: FoxP3 2-1 (BS-DNA) | methyliert | 1:100 | 120.000.000 |
| Plasmid-DNA: FoxP3 2-1 (BS-DNA) | methyliert | 1:10000 | 1.200.000 |
| Plasmid-DNA: FoxP3 2-1 (BS-DNA) | unmethyliert | 1:100 | 120.000.000 |
| Plasmid-DNA: FoxP3 2-1 (BS-DNA) | unmethyliert | 1:10000 | 1.200.000 |
| λ -DNA (50 ng/ μ L) | unmethyliert | 1:9 | 50 ng/ μ L |
| Abstrich, BS-DNA | natürlicherweise methyliert | - | 10 ng/ μ L |
| HeLa, BS-DNA | natürlicherweise methyliert | - | 10 ng/ μ L |
| H ₂ O | - | - | - |

Mithilfe der qPCR soll der Erfolg der in-vitro-Methylierung überprüft werden. Es wurde eine Annealing-Temperatur von 62,5 °C verwendet. Nach der Amplifikation des Targets mittels methylierungs- und nicht-methylierungsspezifischer Primer, wurden die Amplifikate aufgeschmolzen und eine Schmelzkurve erstellt. Die Daten aus der Schmelzkurve wurden in einem Schmelzkurven-Diagramm dargestellt. Das Schmelzdiagramm für die Amplifikation mit methylierungsspezifischem Primerpaar (M-PCR) ist in Abbildung 37 dargestellt. Die x-Achse stellt den Temperaturverlauf während des Schmelzkurvenprogrammes dar und die y-Achse repräsentiert die Veränderung der Fluoreszenz-Intensität während der Heizphase zwischen 65°C und 95°C.

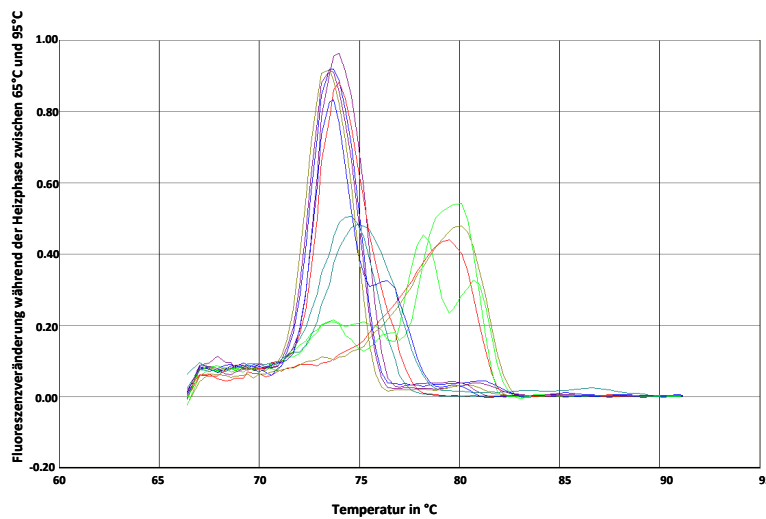


Abbildung 37 Primervalidierung an Kontroll-Plasmiden: M-qPCR (Schmelzkurve)

Jeder einzelne Peak in dem Diagramm steht für ein Amplifikat. Die Primer verhalten sich spezifisch für das gewünschte Target, da in einer Probe während der PCR ein Amplifikationsprodukt entstanden ist (ein PCR-Produkt taucht im Diagramm als ein Peak auf). Die methylierten Proben zeigen einen hohen Peak (linke Seite im Diagramm) und stellen das spezifische Produkt dar. Außerdem werden die Positiv-Kontrollen Abstrich-DNA und HeLa-DNA mit dem methylierungsspezifischen Primer amplifiziert. In den unmethylierten Proben und in den Negativkontrollen (λ -DNA, aqua dest.) wird nicht das spezifische Target amplifiziert, d. h. Lokalisation und Höhe unterscheidet sich von den Peaks der methylierten Proben und Kontrollen (siehe Abbildung 37, rechte Seite).

Die methylierungsspezifischen Primer amplifizieren in den unmethylierten Plasmid-Proben nicht das spezifische Target. Im Gelbild (Abbildung 40) ist bei den unmethylierten Plasmiden ein spezifisches Produkt entstanden (Slot 12, 14), da bei extrem hohen Kopie-Zahlen, wie bei den Plasmiden, eine schwache unspezifische Amplifikation zu beobachten ist. Durch die niedrigen Zahlen an DNA-Kopien in den klinischen Proben, tritt dieser Effekt bei der Methylierungsanalyse der DNA der OvCa-Patientinnen nicht auf.

In den unmethylierten Plasmid-Proben (1:10000-Verdünnung), der Abstrich-Probe und der HeLa-Probe sind während der Amplifikation mit dem methylierungsspezifischen Primerpaar unspezifische Primer-Dimere entstanden (siehe Abbildung 38).

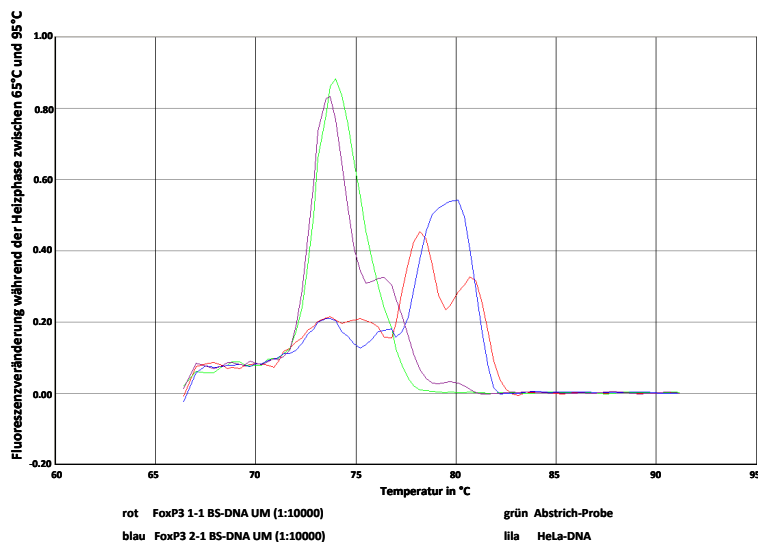


Abbildung 38 Entstehung von Primer-Dimeren während der methylierungsspezifischen qPCR (Schmelzkurve)

In der Abbildung ist erkennbar, dass neben den spezifischen Produkten ein kleinerer Peak entstanden ist. Dieser stellt die entstandenen Primer-Dimere dar. Durch den Auftrag der PCR-Produkte auf ein Agarose-Gel konnten die Ergebnisse aus der qPCR bestätigt werden (siehe Abbildung 40).

Die Schmelzkurven der einzelnen Proben für das nicht-methylierungsspezifische Primerpaar (NM-PCR) sind aus Abbildung 39 zu entnehmen.

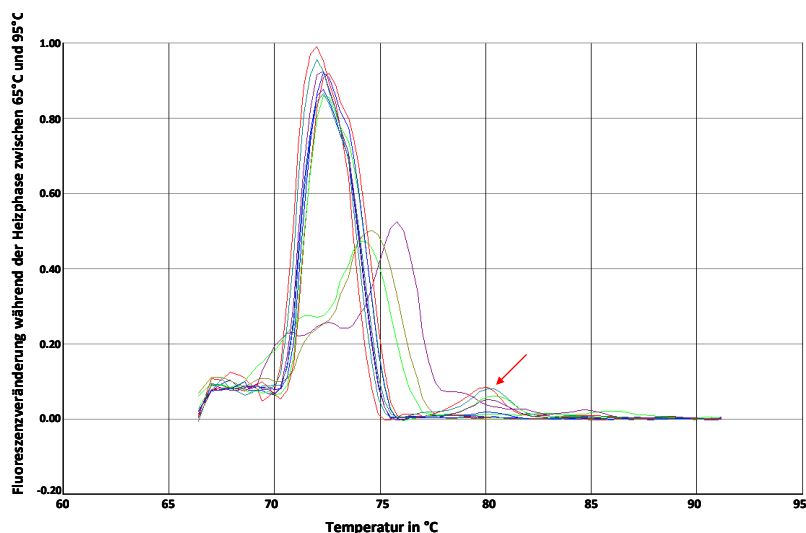


Abbildung 39 Primervalidierung an Kontroll-Plasmiden: NM-qPCR (Schmelzkurve)

Das nicht-methylierungsspezifische Primerpaar amplifiziert spezifisch ein Produkt auf der Grundlage der Target-DNA. In Abstrich-DNA, λ -DNA und aqua dest. wurde das spezifische Target jeweils nicht amplifiziert, wie aus dem Gelbild Abbildung 40 (Slot 5, 6,7) erkennbar ist.

In der Schmelzkurve erscheinen die unspezifischen Produkte (Primer-Dimere) als niedrigere Peaks, die sich rechts neben der spezifischen Kurven-Schar darstellen (Kurve: grün, ocker, lila). Die Primer-Dimere sind im Agarose-Gel weiter gelaufen als die spezifischen PCR-Produkte.

Mit dem nicht-methylierungsspezifische Primerpaar wurde die methylierte Plasmid-DNA amplifiziert, was darauf schließen ließ, dass das Plasmid unvollständig methyliert wurde und damit in der Bisulfit-Behandlung kein Sequenzunterschied eingeführt werden konnte.

In einigen Proben ist neben dem Peak des spezifischen Produkts eine kleine Schulter im Kurven-Verlauf erkennbar (siehe Abbildung 39 roter Pfeil). Diese Schultern entstehen in den Kontroll-Plasmid-Proben bei der jeweils höheren Konzentration (1:100-Verdünnung). Bei den niedrigeren DNA-Konzentrationen verschwinden die Schultern jeweils. Im Gelbild sind jeweils nur die spezifischen Produkte sichtbar und daher handelt es sich bei den kleinen Peaks (roter Pfeil) nicht um Primer-Dimere (siehe Abbildung 40 Slots 1-4)

Einzelne PCR-Produkte aus der qPCR wurden auf ein 2%-iges Agarosegel aufgetragen (siehe Abbildung 40).

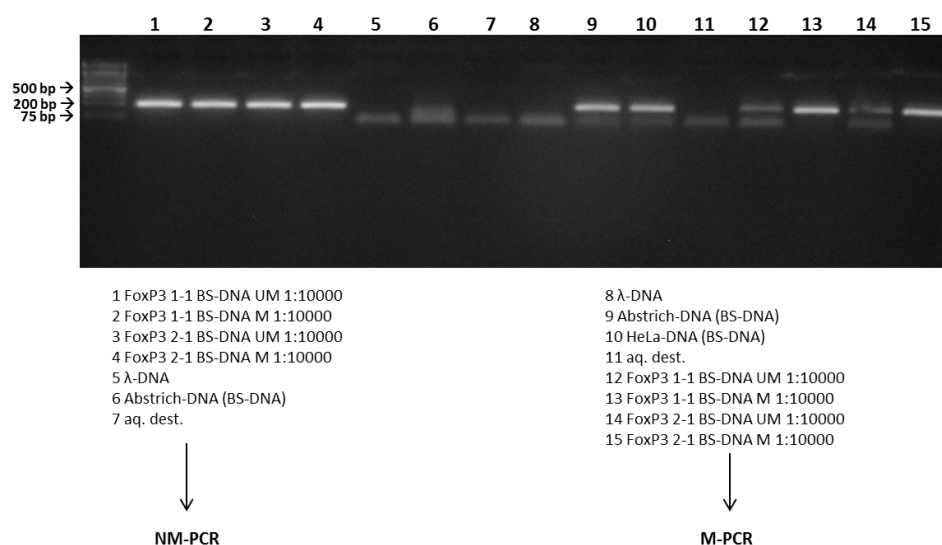


Abbildung 40 Agarose-Gelbild: Primervalidierung an Kontroll-Plasmiden

Unmethylierte Plasmide (1:10.000-Verdünnung), Abstrich-Probe und HeLa-DNA, die jeweils mit dem nicht-methylierungsspezifischen Primerpaar amplifiziert wurden, weisen zwei PCR-Produkte auf, da neben dem spezifischen Produkt Primer-Dimere amplifiziert wurden. Zwischen den Amplifikaten, welche mit dem methylierungsspezifischen und nicht-methylierungsspezifischen Primerpaar vermehrt wurde, kann nicht differenziert werden. Der Grund dafür liegt in einer unvollständigen Methylierung der Kontroll-Plasmide. Die Primerpaare für die methylierungsspezifische und die nicht-methylierungsspezifische PCR sind

spezifisch (siehe zusätzlich Kapitel 5.2.3 Primer-Validierung – Überprüfung der Primer-Spezifität).

Bei der methylierungsspezifischen qPCR entstehen Primer-Dimere, die sich als eine Bande unterhalb der 75 bp-Bande des Standards zeigt.

Primer-Dimere entstehen bei der Hybridisierung von zwei Primern (Oligonukleotide) und deren Elongation zu kurzen doppelsträngigen Oligonukleotiden. Die Primer-Dimere senken die PCR-Effizienz und verbrauchen Nukleotide, welche für die Amplifikation der Target-DNA zur Verfügung stehen müssen. Außerdem werden Primer verbraucht, welche eine Vermehrung des Targets initialisieren sollen. Die kurzen doppelsträngigen Oligonukleotide stören das gewünschte PCR-Produkt.

Um die Primer-Dimere während der Amplifikation zu vermeiden, wurden in den weiteren Experimenten verschiedene Annealing-Temperaturen und Primer-Konzentrationen ausgetestet.

Gradienten-PCR – Austesten unterschiedlicher Annealing-Temperaturen

Die Optimierung der in der PCR verwendeten Annealing-Temperatur wurde mittels eines Gradienten in einem herkömmlichen PCR-Cycler (mit Gradienten-Funktion) von Eppendorf durchgeführt. An dem Gerät wurde ein Gradient von ± 4 °C ausgehend von einer Temperatur von 62 °C eingestellt, um verschiedene Temperaturen während des Annealing-Prozesses zu erzeugen. Die in die PCR eingesetzten Proben sind in Tabelle 43 aufgeführt. Die Plasmid-DNA wurde vor ihrer Verwendung 1:20.000 in aqua dest. verdünnt.

Tabelle 43 Probenet Methylierungsanalyse - Gradienten-PCR

| Proben-Nr. | Probenbezeichnung | Konzentration/ Anzahl Plasmid-Kopien |
|------------|---|---|
| 1 | K6; methylierte Bisulfit-behandelte DNA | 5 ng/μL |
| 2 | Plasmid-DNA; unmethyliert (1:20.000 verdünnt) | 450.000/μL |
| 3 | HaCaT oder HPKII (gDNA) | 10 ng/μL |
| 4 | aqua dest. (Negativkontrolle) | - |

Als PCR-Mix wurde der AmpliTaq™ Gold-Mix der Firma Applied Biosystems verwendet. Es wurden fünf verschiedene Annealing-Temperaturen an den PCR-Ansätzen getestet und die Menge an entstandenem PCR-Produkt sowie das Vorkommen von Primer-Dimeren bestimmt. Die in der PCR getesteten Temperaturen während des Annealing-Prozesses betrugen 58,1 °C; 60,2 °C; 62,4 °C; 64,5 °C und 66,1 °C.

Für die Auswertung der Daten muss zwischen der Menge an PCR-Produkt und den entstandenen Primer-Dimeren abgewogen werden, d. h. die Menge an spezifischem PCR-Produkt muss bei gleichzeitigem Auftreten von Primer-Dimeren hoch genug sein.

Um einzuschätzen, welche der angelegten Annealing-Temperaturen das Optimum aus amplifiziertem PCR-Produkt und reduzierter Menge an Primer-Dimeren darstellt, wurden die Daten aus den Schmelzkurven und der Gelelektrophorese herangezogen. Die Schmelzkurven der Gradienten-PCR für methylierungs- und nicht-methylierungsspezifische PCR sind dem Anhang zu entnehmen. Das Gelbild, welches die Ergebnisse der methylierungsspezifischen PCR darstellt, ist in Abbildung 41 aufgeführt.

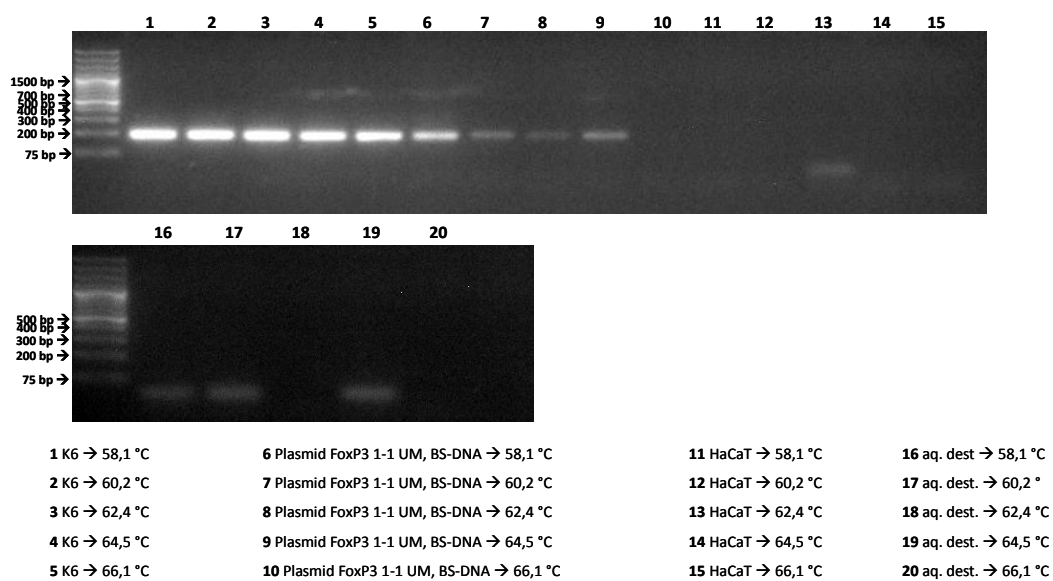


Abbildung 41 Methylierungsanalyse: Gradient: M-PCR

In Probe K6 liegt FoxP3 methyliert vor (Abstrich-Probe, Epithelzellen ohne regulatorische T-Zellen), sodass bei einer Amplifikation mit dem methylierungsspezifischen Primerpaar ein spezifisches Produkt entstanden ist (siehe Abbildung 42, Slots 1-5). Die Menge an gebildetem Produkt nimmt mit steigender Annealing-Temperatur leicht ab. Laut den Daten aus der Schmelzkurve ist bei einer Temperatur von 62,4 °C am meisten spezifisches PCR-Produkt, bei gleichzeitig wenigen Primer-Dimeren, entstanden. Bei einer Temperatur von 64,5 °C ist in der Schmelzkurve neben dem spezifischen Produkt ein unspezifisches Amplifikat zu erkennen, welches in der Gelelektrophorese nicht auftritt.

Das Kontroll-Plasmid FoxP3 1-1 ist unmethyliert (keine in-vitro Methylierung), aber mit Bisulfit-behandelt. Dadurch, dass eine hohe Kopie-Zahl in die PCR eingesetzt wurde (450.000 Kopien), hat das Primerpaar bei einer Annealing-Temperatur von 58,2 °C ein spezifisches Produkt amplifiziert. Um herauszufinden, wann dieses Produkt bei der Amplifikation entsteht, müsste eine qPCR durchgeführt werden. Mit steigender Annealing-Temperatur nimmt die Menge an

spezifischem PCR-Produkt bis zu einem Wert von Null ab. Aus der Schmelzkurve geht hervor, dass neben dem spezifischen Produkt bei keiner der getesteten Temperaturen Primer-Dimere entstanden sind. Die größte Menge an PCR-Produkt ist bei einer Annealing-Temperatur von 58,1 °C entstanden.

Die HaCaT-DNA (nicht mit Bisulfit behandelt) enthält nicht die Target-Sequenz, sodass es durch die Primer zu keiner Amplifikation kommt. Die Bande bei 62,4 °C (Slot 13) stellt ein unspezifisches Amplifikat dar, welches als einzelner Peak in der Schmelzkurve erscheint. Für alle weiteren Temperaturen sind in den Proben weder spezifische Produkte noch unspezifische Primer-Dimere entstanden. Die Wasserkontrolle ist bezüglich des spezifischen Amplifikationsproduktes negativ (Slots 16-20).

Während der PCR wurden Primer-Dimere gebildet, welche als Banden mit einer Größe von weniger als 75 bp auftreten. Bei einer Temperatur von 62,4 °C und 66,1 °C sind keine Primer-Dimere entstanden. Der Kurvenverlauf bei dem Aufschmelzen der PCR-Produkte zeigte bei 62,4 °C und 66,1 °C keinen Peak, was im Gelbild ebenfalls zu sehen ist, da keine Banden vorhanden sind. Die Schmelzkurven der Gradienten-PCR für methylierungs- und nicht-methylierungsspezifischen Primer sind im Anhang aufgeführt (Abbildung 67, 68). Die Kurvenverlaufs-Daten für 58,1 °C, 60,2 °C und 64,5 °C ergaben jeweils einen Peak, dieser stellt allerdings nicht das spezifische PCR-Produkt, sondern entstandene Primer-Dimere dar.

Die Ergebnisse der nicht-methylierungsspezifischen PCR sind in Abbildung 42 dargestellt.

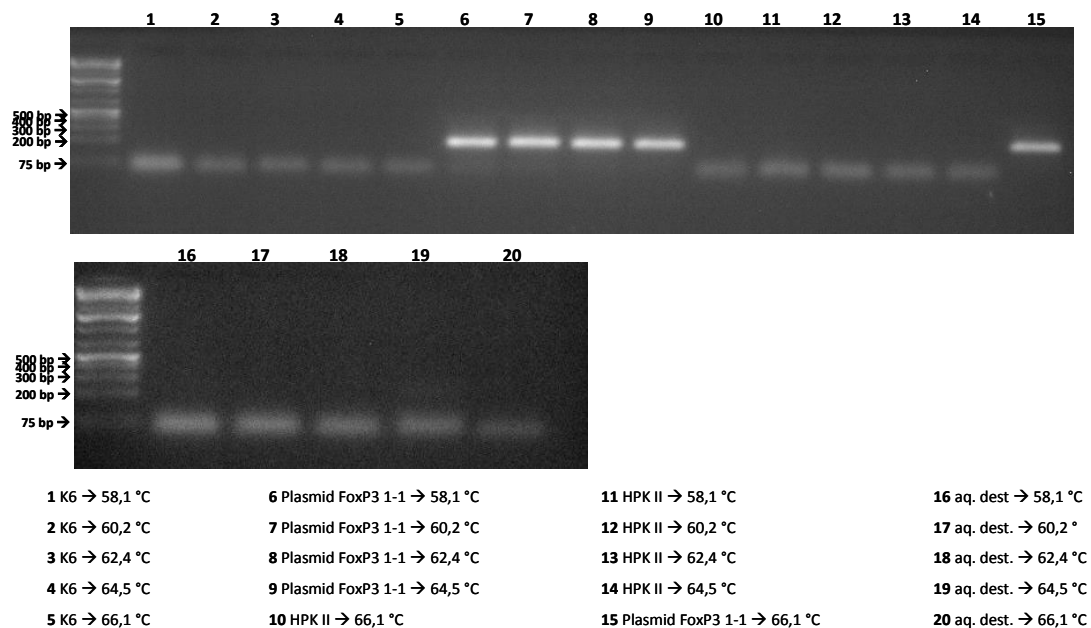


Abbildung 42 Methylierungsanalyse: Gradient: NM-PCR

In der Probe K6 (FoxP3 methyliert) wurde mit dem nicht-methylierungsspezifischen Primer kein spezifisches Produkt amplifiziert. Es sind während der PCR Primer-Dimere mit einer Größe

von etwa 75 bp entstanden. Diese unspezifischen Produkte nehmen mit steigender Annealing-Temperatur ab (siehe Abbildung 42 Slots 1-5), was sich als eine Abnahme der Bandenintensität zeigt. In der Schmelzkurve (siehe Anhang) stellen die Peaks die Primer-Dimere dar und nicht das spezifische Produkt.

Das Kontroll-Plasmid FoxP3 1-1 liegt unmethyliert (keine In-Vitro-Methylierung) und mit Bisulfit behandelt vor. Das Primerpaar, welches den FoxP3-Genabschnitt amplifiziert wenn dieser nicht-methyliert vorliegt, führte zur Vermehrung des spezifischen Targets in der Plasmid-Probe (Slots 6-9 und Slot 15). Bei einer Temperatur von 66,1 °C ist am wenigsten Produkt amplifiziert worden (Slot 15). Die Menge der in den Proben gebildeten Primer-Dimere sinkt mit steigender Annealing-Temperatur. Bei 64,5 °C und 66,1 °C sind die Primer-Dimere vollständig verschwunden. Die Schmelzkurve zeigt für jede Temperatur ein spezifisches Produkt. Die Primer-Dimere weisen in etwa die gleiche Schmelztemperatur (Temperatur bei der Fluoreszenzänderung maximal ist) auf wie das spezifische Amplikon.

Die HPKII-DNA (Slot 11-14 und Slot 10) zeigte keine Amplifikation eines spezifischen PCR-Produktes, sondern nur die Vermehrung von Primer-Dimeren. Dabei bleibt die Menge der Dimere über die einzelnen Temperatur-Erhöhen bis zu einer Temperatur von 64,5 °C konstant. Bei der Annealing-Temperatur 66,1 °C ist die Menge an Primer-Dimer etwas niedriger, was auch die Daten aus der Schmelzkurve mit einem niedrigeren Peak bestätigen. Die Schmelzkurve zeigte Primer-Dimere bei allen getesteten Temperaturen. Die Schmelzpunkte der einzelnen unspezifischen Dimere liegen im Bereich der des spezifischen Produktes (etwa 75 °C), daher ist eine Vermeidung ihrer Entstehung schwierig zu handhaben. Eine zusätzliche Erhöhung der Temperatur (zusätzlicher Temperaturschritt), während des Aufschmelzens der PCR-Produkte, würde die unspezifischen Primer-Dimere aufschmelzen. Durch die ähnlichen Schmelzpunkte spezifischer und unspezifischer Amplifikate, würden auch die spezifischen Produkte zerstört werden.

Die Wasserkontrolle (Negativkontrolle) ist bezüglich des spezifischen Amplifikationsproduktes negativ (Slots 16-20). Es wurden Primer-Dimere während der PCR gebildet, welche als Banden mit einer Größe von 75 bp auftreten. Diese bleiben in ihrer Menge beständig, da sich die Intensität der Banden nicht vermindert. Die letzte Temperatur (66,1 °C) zeigte im Gegensatz zu den anderen Temperaturen eine minimal schwächere Bande, was darauf schließen lässt, dass in dieser Probe weniger Primer-Dimer gebildet wurde als innerhalb des Temperatur-Spektrums von 58,1 °C bis 64,5 °C. Die Schmelzkurve zeigte bei allen Temperaturen unspezifische Primer-Dimere.

Die Auswertung der Schmelzkurven und Gelelektrophorese ergab für die methylierungsspezifische und nicht-methylierungsspezifische PCR eine optimale Annealing-Temperatur von jeweils 62°C.

In der nicht-methylierungsspezifischen PCR sind mehr Primer-Dimere entstanden als während der methylierungsspezifischen PCR. Die Schmelztemperaturen der entstandenen Primer-Dimere liegen im Bereich der des spezifischen PCR-Produkts. Eine Zerstörung der Primer-Dimere mittels eines zusätzlichen Zyklus während der Aufschmelzung der DNA nach der PCR, würde das spezifische Produkt ebenfalls zerstören.

Außerdem wurden methylierungs- und nicht-methylierungsspezifische Gradienten-PCR mit dem PCR-Mix FastStart Universal von Roche durchgeführt. In dieser PCR sind mehr Primer-Dimere aufgetreten als bei Verwendung des AmpliTaq™ Gold-Mix.

Austesten verschiedener Primer-Konzentrationen

Die bei der Amplifikation mit dem nicht-methylierungsspezifischen Primerpaar entstandenen Primer-Dimere wurden durch das Austesten verschiedener Primer-Konzentrationen versucht zu minimieren. Für das nicht-methylierungsspezifische Primerpaar aus Forward- und Reverse-Primer wurden die Primer-Konzentrationen an unterschiedlichen Verdünnungen der Plasmid-DNA ausgetestet. Von der unmethylierten, Bisulfit-behandelten Plasmid-DNA (27,6 ng/μL) wurden anhand Tabelle 44 in einer seriellen Verdünnungen verschiedene Verdünnungsstufen hergestellt.

Tabelle 44 Probenset: Primer-Konzentrationen austesten

| Volumen Plasmid-DNA, aqua dest. (μL) | Verdünnung | DNA-Konzentration (pg/μL) | Anzahl Kopien pro μL |
|--|------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------|
| 5 μL (Plasmid-DNA 27,6 ng/μL) + 1145 μL (1:230) | 1:230 | 120 | 36.000.000 |
| 2 μL (Plasmid 120 pg/μL) + 198 μL (1:100) | 1:2.300.000 (Verdünnung I) | 1,2 | 360.000 |
| 50 μL (Verdünnung I) + 450 μL (1:10) | 1:23.000.000 (Verdünnung II) | 0,12 | 36.000 |
| 50 μL (Verdünnung II) + 450 μL (1:10) | 1:230.000.000 (Verdünnung III) | 0,012 | 3.600 |
| 50 μL (Verdünnung III) + 450 μL (1:10) | 1:2.300.000.000 (Verdünnung IV) | 0,0012 | 360 |
| 50 μL (Verdünnung IV) + 450 μL (1:10) | 1:23.000.000.000 (Verdünnung V) | 0,00012 | 36 |

Zu den hergestellten PCR-Mixen (AmpliTaq™ Gold-Mix) wurden die unterschiedlich konzentrierten Primerlösungen, bestehend aus Forward- und Reverse-Primer, nach den Angaben aus Tabelle 45 zugegeben. Die einzelnen Primer-Konzentrationen wurden aus der

Arbeitslösung von 5 pmol/μL hergestellt. Der Primer wurde unverdünnt (5 pmol/μL) in die qPCR eingesetzt und die Konzentrationen 3,75 pmol/μL, 2,5 pmol/μL, 1,25 pmol/μL sowie 0,625 pmol/μL durch Verdünnung in aqua dest. erzeugt (siehe Tabelle 45). Das Volumen der zum 1x-PCR-Ansatz zugegeben verdünnten Primerlösung betrug 2 μL.

Tabelle 45 Zusammensetzung der verschieden-konzentrierten ausgetesteten Primer-Konzentrationen

| Primer-Konzentration (pmol/μL) | Primer 1x-Ansatz (μL) | H ₂ O 1x-Ansatz (μL) | Σ Volumen Primer-Lösung (μL) |
|--------------------------------|-----------------------|---------------------------------|------------------------------|
| 5 | 2 | - | 2 |
| 3,75 | 1,5 | 0,5 | 2 |
| 2,5 | 1 | 1 | 2 |
| 1,25 | 0,5 | 1,5 | 2 |
| 0,625 | 0,25 | 1,75 | 2 |

Die Amplifikation mit dem Real-Time-Gerät wurde mit einer Annealing-Temperatur von 62,5 °C durchgeführt. Die Schmelzkurven-Daten aus der Real-Time-PCR sind im Anhang (siehe Abbildung 75-79) aufgeführt. Die Auftrennung der PCR-Produkte in einer Gelelektrophorese ist in Abbildung 43 dargestellt.

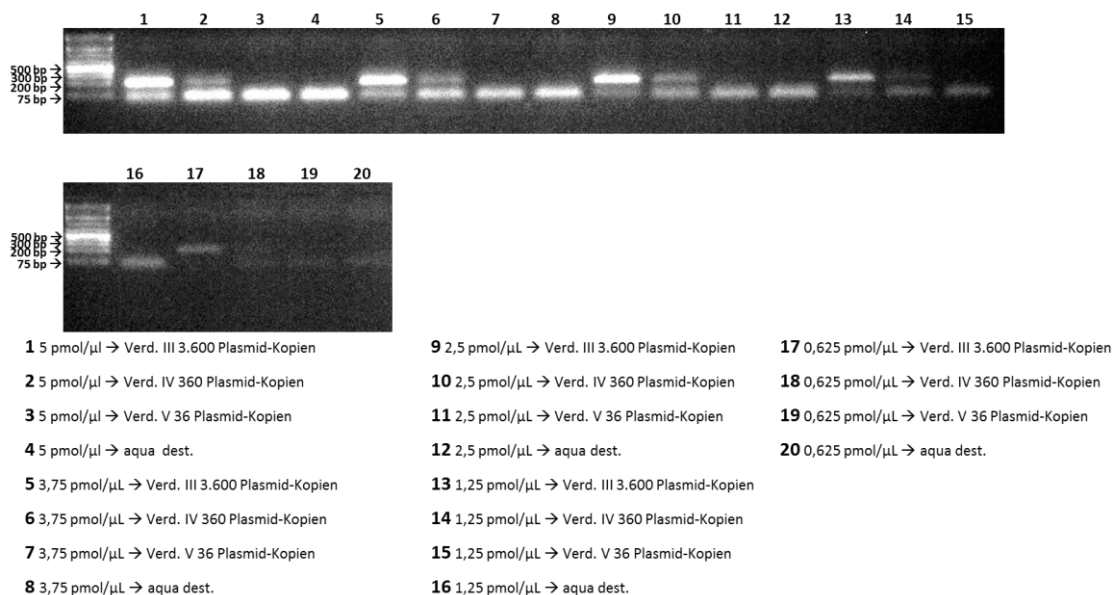


Abbildung 43 Gelbild: Austesten verschiedener Primer-Konzentrationen (NM-qPCR)

In dem Gelbild laufen die spezifischen PCR-Produkte bei einer Größe von ungefähr 200 bp und die Primer-Dimere bei einer Basenpaar-Länge von 75 bp.

Bei einer Primer-Konzentration von 5 pmol/μL lag bei den beiden höchsten Plasmid-Kopie-zahlen (Slot 1 und 2) das spezifische Produkt vor, währenddessen dieses bei der niedrigsten Plasmid-Kopiezahl (Slots 3) verschwindet. Die Menge an Primer-Dimeren bleibt konstant.

In den Proben mit einer Primer-Konzentration von 3,75 pmol/μL und 2,5 pmol/μL nahm die Menge an spezifischem PCR-Produkt mit sinkender Anzahl an Plasmid-Kopien (Slots 5-7 für

3,75 pmol/ μ L und Slots 9-11 für 2,5 pmol/ μ L) ab und verschwindet bei der niedrigsten Kopie-Zahl.

Die Primer-Konzentration von 1,25 pmol/ μ L weist im Vergleich zu den anderen Konzentrationen in der 3600 Kopie/ μ L-Probe die kleinste Menge an spezifischem PCR-Produkt auf, welche mit sinkender Plasmid-Zahl weiter sinkt. Bei einer Konzentration des Primers von 0,625 pmol/ μ L lag bei 3.600 Plasmiden/ μ L (Slot 14) sehr wenig spezifisches Amplifikat vor und es sind keine Primer-Dimere unspezifisch amplifiziert worden. Mit sinkender Plasmid-Zahl nimmt die Menge des spezifischen Produktes weiter ab (Slot 18 und 19) und es treten in beiden Proben, wenn auch vergleichsweise wenig, Primer-Dimere auf.

Die Wasserkontrollen zeigten bei keiner verwendeten Primer-Konzentration ein spezifisches Produkt. Mit sinkender Konzentration des Primers nahm in den Negativkontrollen auch die Menge an unspezifischen Dimeren ab.

Bei den Konzentrationen 5 pmol/ μ L, 3,75 pmol/ μ L und 2,5 pmol/ μ L lag bei einer Plasmid-Zahl von 3600 Kopien jeweils eine große Menge an Primer-Dimeren vor. Diese sinkt bei einer Konzentration von 1,25 pmol/ μ L. Innerhalb einer Primer-Konzentration von 5 pmol/ μ L sank die Menge an Primer-Dimeren zwischen einer Plasmid-Zahl von 3.600 Kopien, 360 Kopien und 36 Kopien nicht (Slot 1, 2, 3).

Genauso verhalten sich die Mengen des unspezifischen Produktes bei einer Konzentration von 3,75 pmol/ μ L (Slot 5, 6, 7).

Bei einer Primer-Konzentration von 2,5 pmol/ μ L nahm die Menge an unspezifischem Produkt mit steigender Plasmid-Zahl zu (Slots 9 bis 11). Dieses Verhalten der Quantität an Primer-Dimeren war auch bei einer Primer-Konzentration von 1,25 pmol/ μ L zu beobachten. Die niedrigste Konzentration des Primers (0,625 pmol/ μ L) zeigte eine Zunahme der unspezifischen Produkte mit zunehmender Menge an Target-DNA, durch die größere Anzahl an Plasmid-Kopien.

Die Primer-Konzentration von 1,25 pmol/ μ L zeigte bei einer Plasmid-Zahl von 3.600 Kopien im Vergleich zu den anderen Primer-Konzentrationen wenig spezifisches Amplifikat und eine geringere Menge an unspezifischen Primer-Dimeren (Slot 13). Mit sinkender Anzahl an Plasmid-Kopien wurde die Menge an unspezifischem Produkt mehr und die Quantität an spezifischem Produkt weniger.

Bei der niedrigsten Konzentration an Forward- und Reverse-Primer (0,625 pmol/ μ L) wurde bei 3.600 Plasmid-Kopien nur spezifisches Produkt gebildet und es waren keine Primer-Dimere entstanden (Slot 17). Die Quantität an unspezifischem Produkt und die Menge an spezifischem Amplikon über die einzelnen Plasmid-Verdünnungen bis hin zur Wasserkontrolle hinweg waren

am niedrigsten. Bei einer Plasmid-Zahl von 360 Kopien waren vergleichsweise wenige Primer-Dimere entstanden, aber die Quantität an spezifischem Produkt ist ebenfalls sehr klein (Slot 18). Bei 36 Plasmid-Kopien wurde kein spezifisches Amplifikat erzeugt und die Menge an unspezifischem Produkt war sehr klein (Slot 19). Die Wasserkontrolle verhielt bezüglich des spezifischen Amplikons negativ und die Menge an Primer-Dimeren war vergleichsweise (im Vergleich zum spezifischen Produkt) hoch.

Über das gesamte Probenset und alle getesteten Primer-Konzentrationen wurde beobachtet, dass mit sinkender Primer-Konzentration die Menge an spezifischem amplifiziertem PCR-Produkt abnimmt, da keine entsprechende Menge an Primern für eine Amplifikation zur Verfügung steht. Außerdem ist aus dem Experiment erkennbar, dass mit sinkender Zahl an Plasmid-Kopien bei gleicher Primer-Konzentration die Menge an Amplifikat sinkt, da nicht mehr so viel Target-DNA für die Vervielfältigung zur Verfügung steht.

Eine hohe Primer-Konzentration bietet die optimale Voraussetzung für die Entstehung von unspezifischem Produkt, da viele Starter-Oligonukleotide (Primer) vorhanden sind. Eine geringere Zahl an Plasmid-Kopien begünstigt die Bildung von Primer-Dimeren, da die Wahrscheinlichkeit eines unspezifischen Annealings zwischen zwei Primern steigt.

Die Schmelzkurven-Daten (siehe Anhang Abbildung 69) sind für jede Probe in einem Diagramm dargestellt. Die einzelnen Kurven jedes Plots stellen die verschiedenen Primer-Konzentrationen dar.

In den Proben mit 3.600 Plasmid-Kopien wurde das spezifische Produkt amplifiziert, wobei mit sinkender Primer-Konzentration die Menge an PCR-Produkt abnimmt. Eine Ausnahme stellte die Primer-Konzentration von 1,25 pmol/ μ L dar, bei der mehr spezifisches Produkt amplifiziert wurde als bei 2,5 pmol/ μ L. Das ist aus dem Gelbild im Gegensatz zur Schmelzkurve nicht ersichtlich. Die gebildeten Primer-Dimere waren im Schmelzkurven-Diagramm nicht erkennbar, sondern nur anhand der Gelbanden zu erkennen.

Bei einer Plasmid-Kopiezahl von 360 wurde die größte Menge bei einer Primer-Konzentration von 3,75 pmol/ μ L amplifiziert. Die Peaks der Konzentrationen 5 pmol/ μ L und 2,5 pmol/ μ L liegen ungefähr auf der gleichen Höhe, wobei aus der Stärke der Gelbanden hervorgeht, dass mehr PCR-Produkt bei einer Konzentration von 5 pmol/ μ L gebildet wurde. Die entstandenen Primer-Dimere erscheinen in der Schmelzkurve als nicht-geradliniger initialer Kurvenverlauf. Für eine Quantifizierung dieser unspezifischen Produkte wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Die Peaks der Konzentrationen von 1,25 pmol/ μ L und 0,625 pmol/ μ L zeigten nicht das spezifische Produkt, sondern amplifizierte Primer-Dimere, deren Schmelztemperatur mit der des spezifischen Produktes zusammenfällt und eine Unterscheidung aus den Real-

Time-Daten erschwert. Erst mittels DNA-Auftrennung in einer Agarose-Gelelektrophorese können Primer-Dimere von den spezifischen Produkten genau unterschieden werden.

In den Proben mit einer Plasmid-Zahl von 36 Kopien wurden ausschließlich Primer-Dimere amplifiziert. Die größte Menge dieser unspezifischen Produkte wurde bei Primer-Konzentrationen von 5 pmol/ μ L und 3,75 pmol/ μ L vervielfältigt. Mit sinkender Konzentration an Primerlösung nahm ebenfalls die Menge an unspezifischen Amplifikaten ab. Die Peaks der Proben mit 36 Kopien / μ L (Verdünnung V) liegen wesentlich weiter unterhalb als die Peaks der Proben mit 360 Plasmid-Kopien (Verdünnung IV). Dabei ist die Einteilung der beiden y-Achsen der angesprochenen Diagramme zu beachten (siehe Kapitel Anhang, Abbildung 69)

Für die Negativkontrolle (aqua dest.) stellt das Diagramm ebenfalls nur Primer-Dimere dar, welche mit sinkender Primer-Konzentration niedrigere Peaks aufweisen, das heißt deren Menge sinkt.

Die Schmelztemperaturen (Temperatur bei der Fluoreszenzänderung maximal ist) der Primer-Dimere sind nicht mit denen der spezifischen Amplifikations-Produkte identisch, aber sie liegen sehr nah beieinander. Aus den vorliegenden Schmelztemperaturen der amplifizierten Produkte (siehe Schmelzkurven) kann eine Unterscheidung zwischen spezifisch und unspezifisch nicht vorgenommen werden.

Bei keiner der getesteten Primer-Konzentrationen konnten die Primer-Dimere vollständig beseitigt werden. Die geringste Menge an Primer-Dimeren ist bei einer Konzentration von 0,625 pmol/ μ L entstanden, bei der allerdings kein spezifisches Amplifikationsprodukt mehr gebildet wurde.

Die mit dem nicht-methylierungsspezifischen Primerpaar unspezifisch gebildeten PCR-Produkte (Primer-Dimere) konnten weder durch eine Modifikation der Annealing-Temperatur noch durch veränderte Primer-Konzentrationen beseitigt werden. Da für das Problem der Primer-Dimere keine Lösung gefunden wurde und diese nicht minimiert oder vollständig beseitigt wurden, ist eine ausschließlich semiquantitative Auswertung der klinischen Proben bezüglich ihres Methylierungsstatus im FoxP3-Genabschnitt möglich.

5.2.4 Methylierungsanalysen des FoxP3-Genabschnittes mithilfe der qPCR (klinische Proben)

Die DNA-Proben für die methylierungsspezifische bzw. nicht-methylierungsspezifische qPCR wurden aus den Gewebeproben (Gefrierewebe) von Ovarialkarzinompatientinnen gewonnen. Diese Gewebe sind im Voraus mittels Immunhistochemie nach spezifischen Immunzellen angefärbt worden (siehe Kapitel Immunhistochemie). Die DNA wurde aus den Geweben durch Proteinase-K-Verdau (über Nacht bei 56°C im Schüttler) und Phenol-Chloroform-Aufreinigung (siehe Kapitel 4.3.1.1) isoliert. In Vorbereitung auf die qPCR wurden die klinischen Proben der genomischen DNA (gDNA) mit Bisulfit behandelt (Bisulfit-Konvertierung).

Um den Anteil an methylierter und unmethylierter DNA in den klinischen Proben zu beurteilen müssen Referenzproben generiert werden. Dazu wurden verschiedene Verdünnungen von methylierten in unmethylierten Kontroll-Proben (in-vitro methylierte Abstrich-DNA und unmethylierte Plasmid-DNA) hergestellt und mit methylierungs- und nicht-methylierungsspezifischen Primern in einer qPCR amplifiziert (Verdünnungsreihe).

Die Kontrollen selbst mussten vor der Herstellung der Verdünnungen Abstrich-DNA/Plasmid-DNA verdünnt werden. Die Abstrich-DNA (60 ng/μL → 20.000 Kopien/μL) wurde in aqua dest. 1:10 (2000 Kopien pro 1 μL DNA-Lösung) und 1:100 (200 Kopien pro 1 μL DNA-Lösung) verdünnt und die jeweilige Verdünnungsstufe in die Ansätze aus Tabelle 47 eingesetzt. Die Informationen zur Berechnung wie viele Zellen lysiert werden mussten, um reine Abstrich-DNA mit einer Konzentration von 60 ng/μL zu isolieren, sind dem Handbuch „Lab FAQs“ der Firma Roche Diagnostics entnommen. Die Gesamt-DNA-Menge in einer Zelle umfasst ungefähr 6 pg [27], sodass 60 ng/μL DNA-Lösung aus ungefähr 10.000 Zellen isoliert wurden. Aufgrund des diploiden Chromosomensatzes jeder Zelle liegen 20.000 Kopien der DNA vor.

Die Plasmid-DNA (27,6 ng/μL) wurde seriell 1:230, 1:100, 1:100, 1:2, 1:2 und 1:5 in aqua dest. verdünnt (siehe Tabelle 46).

Tabelle 46 serielle Plasmid-Verdünnung (Konzentrationen und Kopie-Zahlen der einzelnen Verdünnungsstufen)

| Volumen Plasmid-DNA, aqua dest. (μL) | Verdünnung anhand der Ausgangskonzentration 27,6 ng/μL | DNA-Konzentration (pg/μL) | Kopie-Zahl/μL |
|---|--|---------------------------|---------------|
| 5 μL (Plasmid-DNA 27,6 ng/μL) + 1145 μL | 1:230 | 120 | 40.000.000 |
| 2 μL (120 pg/μL) + 198 μL | 1:23.000 | 1,2 | 400.000 |
| 2 μL (1,2 pg/μL) + 198 μL | 1:2.300.000 (Verdünnung I) | 0,012 | 4000 |
| 100 μL (Verdünnung I) + 100 μL | 1:4.600.000 (Verdünnung II) | 0,006 | 2000 |
| 100 μL (Verdünnung II) + 100 μL | 1:9.200.000 (Verdünnung III) | 0,003 | 1000 |
| 20 μL (Verdünnung III) + 80 μL | 1:46.000.000 (Verdünnung IV) | 0,0006 | 200 |

Die Angaben darüber, wie viele Plasmid-Kopien sich in den einzelnen Verdünnungsstufen befinden, wurden anhand der Informationen aus dem Labor-Handbuch „Lab FAQs“ der Firma Roche Diagnostics berechnet. Es wurde auf Grundlage der Größe des haploiden menschlichen Genoms ($3,3 \cdot 10^9$ bp), dessen Masse berechnet. [URL-50] Das Gewicht eines einzelnen Nukleotids beträgt 325 Da. [URL-51] Die Masse des menschlichen Genoms beträgt somit $2145 \cdot 10^9$ Da. Größe und Masse des Menschen-Genoms werden zur Größe des Plasmids (3000 bp) in Verhältnis gebracht und die Masse eines einzelnen Plasmids berechnet ($195 \cdot 10^4$ Da). Das molekulare Gewicht (Da) wurde in die Einheit Mikrogramm umgerechnet ($3,2381 \cdot 10^{-12}$ µg). [URL-52] Mittels einer Verhältnisgleichung wurde die Menge der Plasmid-Kopien in 1 µg DNA-Lösung ausgerechnet. In 1 µg DNA liegen $3 \cdot 10^{11}$ und in 1 ng DNA $3 \cdot 10^8$ Plasmid-Kopien vor. Die Zusammensetzung der einzelnen Verdünnungsstufen aus methylierter Abstrich-DNA in unmethylierter Plasmid-DNA (bezeichnet nach dem Anteil an methylierter Abstrich-DNA) ist in Tabelle 47 aufgeführt.

Tabelle 47 Verdünnungsreihe aus Abstrich-DNA und Plasmid-DNA für MSP

| Anteil methylierte DNA | methylierte Abstrich-DNA | | | unmethylierte Plasmid-DNA | | | H ₂ O (µL) | Σ (µL) |
|------------------------|--------------------------|------------|------------|---------------------------|---------------------------------|------------|-----------------------|--------|
| | Volumen (µL) | Verdünnung | Kopie-Zahl | Vol. (µL) | Verdünnung | Kopie-Zahl | | |
| 100 % | 10 | 1:10 | 20.000 | - | - | - | 1 | 11 |
| 99 % | 9,9 | 1:10 | 19.800 | 1 | 1:46000000 (Verdünnung IV) | 200 | - | 11 |
| 95 % | 9,5 | 1:10 | 19.000 | 1 | 1:9.200.000 (Verdünnung III) | 1000 | 0,5 | 11 |
| 90 % | 9 | 1:10 | 18.000 | 1 | 1:4.600.000 (Verdünnung II) | 2000 | 1 | 11 |
| 80 % | 8 | 1:10 | 16.000 | 1 | 1:2.300.000 (Verdünnung I) | 4000 | 2 | 11 |
| 50 % | 5 | 1:10 | 10.000 | 2,5 | 1:2.300.000 (Verdünnung I) | 10.000 | 3,5 | 11 |
| 30 % | 3 | 1:10 | 6.000 | 3,5 | 1:2.300.000 (Verdünnung I) | 14.000 | 4,5 | 11 |
| 10 % | 1 | 1:10 | 2.000 | 4,5 | 1:2.300.000 (Verdünnung I) | 18.000 | 5,5 | 11 |
| 5 % | 5 | 1:100 | 1.000 | 4,75 | 1:2.300.000 (Verdünnung I) | 19.000 | 1,25 | 11 |
| 1 % | 1 | 1:100 | 200 | 4,95 | 1:2.300.000 (Verdünnung I) | 19.800 | 5 | 11 |
| 0 % | - | - | - | 5 | 1:2.300.000 (Verdünnung I) | 20.000 | 6 | 11 |

Vom Gesamtansatz (11 µL) einer jeden Verdünnungsstufe wurde jeweils 1 µL der Verdünnung aus Abstrich-DNA und Plasmid-DNA in die methylierungsspezifische und nicht-methylierungsspezifische qPCR eingesetzt. Das bedeutet, dass sich in jeder Referenz-Kontrolle

jeweils nur 1/10 der Kopie-Zahlen (von Abstrich- und Plasmid-DNA) aus Tabelle 47 befunden haben.

In der qPCR wurden die Verdünnungen 100 % methyliert, 99 % methyliert, 90 % methyliert, 10 % methyliert, 1% methyliert und 0 % methyliert aus Abstrich-DNA und Plasmid-DNA mitgeführt.

Als Kontrollen für die methylierungs- und nichtmethylierungsspezifische qPCR wurden neben der Verdünnungsreihe jeweils 2000 Kopien/ μL von Bisulfit-behandelter Plasmid-DNA und Bisulfit-behandelter Abstrich-DNA verwendet sowie Nuklease-freies Wasser (Negativkontrolle) eingesetzt. Die Plasmid-DNA (27,6 ng/ μL) wurde daher in Vorbereitung auf die Amplifikation in einer seriellen Verdünnung 1:230 (120 pg/ μL), 1:100 (1,2 pg/ μL) und 1:200 (0,006 pg/ μL) mit aqua dest. zusammengebracht. Die Abstrich-DNA (60 ng/ μL) wurde 1:10 in aqua dest. verdünnt.

Die Menge an Bisulfit-behandelter genomischer DNA wurde mithilfe einer qPCR des Housekeeping-Gens β -Aktin bestimmt. Die Annealing-Temperatur bei der Amplifikation mit dem Primerpaar für β -Aktin liegt bei 60,0 °C. Mit dem NanoDrop ist diese Quantifizierung nicht möglich, da die DNA durch die Behandlung mit Bisulfit stark fragmentiert vorliegt und die gemessene Menge an „Nukleotiden“ nicht mit der Menge an amplifizierbarer DNA (>100bp) korrelieren muss.

Das Housekeeping-Gen für β -Aktin wurde als Standardisierung für die qPCR genutzt. Die Menge methylierter bzw. nicht-methylierter Bereiche im FoxP3-Gen wurde auf die Menge von β -Aktin geeicht und bezogen. Das Gen kodiert für das globuläre Strukturprotein Aktin, das sich im Zytoskelett und im Sarkomer der Muskelfasern finden lässt. Aktin kommt in fast allen eukaryotischen Zellen vor und weist eine konservierte Struktur auf. [URL-53] Aufgrund der Bedeutung als Housekeeping-Gen ist dieser Genombereich nicht deletiert und kann als interne DNA-Referenz verwendet werden. Die Menge an β -Aktin wird 100 % gleichgesetzt und das Target-Gen damit verglichen. [Li Z, Yang L, Wang J, et al., 2010]

Die 33 klinischen Proben, eine Abstrich-Probe (1:10-Verdünnung \rightarrow 6 ng/ μL) als Kontrolle und eine Wasserprobe als Negativkontrolle (Σ 35 Proben) wurden in die β -Aktin-qPCR eingesetzt.

Die aus der qPCR generierten Schmelzkurven sind im Anhang (siehe Abbildung 70 bis 74) aufgeführt. Die Schmelzkurven wurden für die klinischen Proben nach methylierungs- und nicht-methylierungsspezifischer qPCR erstellt. Die Verdünnungsreihe und die Wasserkontrolle wurden jeweils für die beiden Amplifikationen in einer eigenen Schmelzkurve dargestellt.

Die Amplifikationsplots der qPCR zur Methylierungsanalyse der klinischen Proben und die als Kontrolle eingesetzte Verdünnungsreihe sind in der Abbildung 44 dargestellt.

Die Amplifikationsplots für die klinischen Proben sind nach methylierungs- und nicht-methylierungsspezifisch im oberen Teil der Abbildung aufgeführt. Verdünnungsreihe (100 % Methylierung, 99 % Methylierung, 90 % Methylierung, 10 % Methylierung, 10 % Methylierung, 1 % Methylierung und 0 % Methylierung) und Wasserkontrolle sind im unteren Teil der Abbildung dargelegt.

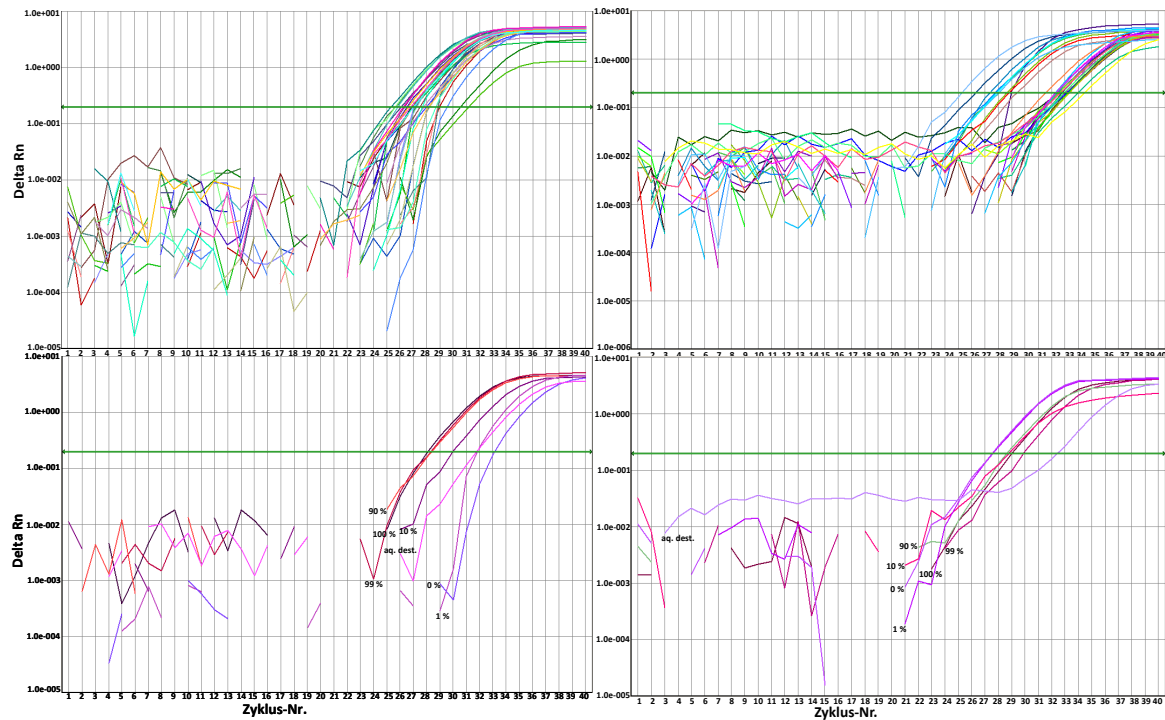


Abbildung 44 Methylierungsanalyse: Amplifikationsplots klinische Proben u. Kontrollen

links oben: M-qRT-PCR klinische Proben; rechts oben: NM-qRT-PCR klinische Proben; links unten: M-qRT-PCR Verdünnungsreihe u. Wasserkontrolle; rechts unten: NM-qRT-PCR Verdünnungsreihe u. Wasserkontrolle

Der Amplifikationsplot für die qPCR mit dem Housekeeping-Gen β -Aktin ist in Abbildung 45 wiedergegeben. In dem Diagramm sind neben den klinischen Proben die 1:10-verdünnte Abstrich-DNA (Kontrolle) und die Wasserkontrolle (Negativkontrolle) dargelegt.

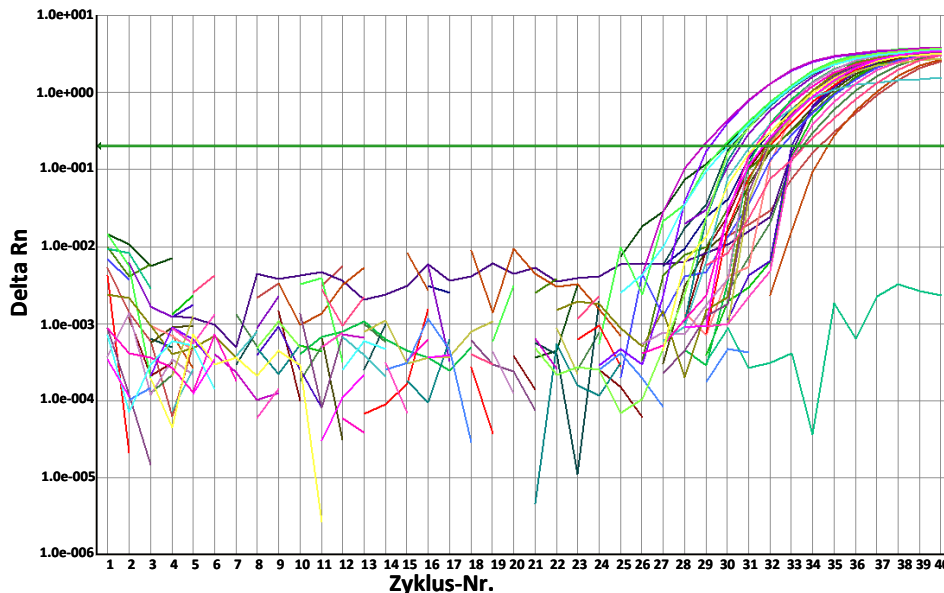


Abbildung 45 Amplifikationsplot: Beta-Aktin (klinische Proben, Kontrollen: Abstrich-DNA u. aqua dest.)
türkise Linie rechte Seite: Wasserkontrolle

Im Amplifikationsplot ist auf der y-Achse die Änderung des gemessenen Fluoreszenzsignals gegenüber der Basislinie (*Delta Rn*) gegen die Zyklus-Nummer auf der x-Achse (*Cycle Number*) dargestellt (*Delta Rn versus Cycle*). Das Programm berechnet diese Basislinie aus den Fluoreszenz-Rohdaten (*Rn*) über einen Algorithmus. Beim Einstellen des Parameters „Baseline“ auf „Auto“ berechnet das Programm für jede Probe einzeln diese Basislinie. Dabei werden die Fluoreszenzen in den einzelnen Zyklen bestimmt, solange diese einen konstanten Wert haben und es zu keinem starken Anstieg kommt. Aus dem konstanten Verlauf der Fluoreszenz-Intensität wird die Basislinie berechnet.

Das im unteren Bereich des Diagramms erkennbare Rauschen wird durch Hintergrundsignale hervorgerufen. Dieses Rauschen beeinflusst die gemessenen Daten der klinischen Proben nicht.

Die waagerechte grüne Linie stellt den Schwellwert (threshold) dar, bei dem der initiale Punkt des exponentiellen Wachstums der Fluoreszenzänderung (*Delta Rn*) und damit des Kurvenanstiegs liegt. Als Auswertungskriterium für die qPCR diene der Zeitpunkt (Zyklusnummer), bei dem die gemessene Fluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant und stetig überschreitet (engl. cycle threshold C_t), das heißt bei dem der exponentielle Anstieg des Fluoreszenzsignals beginnt. Der C_t -Wert wurde zur Quantifizierung der DNA-Moleküle herangezogen, die bei der qPCR gebildet wurden. Umso größer die Menge der Ausgangs-DNA

in einer Probenlösung vor der Amplifikation war, desto schneller wurde ein Fluoreszenzsignal generiert. Das bedeutet wiederum, dass die Fluoreszenz den Schwellwert in einem früheren Zyklus übersteigt und der C_t -Wert umso niedriger liegt. Die C_t -Werte der einzelnen Proben wurden miteinander verglichen. Als Voraussetzung für diesen Vergleich müssen die Amplifikationen mit der gleichen Effizienz erfolgt sein. [Kück, 2005]

Auswertung methylierungsspezifische qPCR

Die C_t -Werte für β -Aktin und die methylierungsspezifische qPCR wurden für die einzelnen Proben aus dem Programm exportiert. Die Daten sind im Anhang in Tabelle 61 zusammengefasst. Aus den Daten wurde die Methylierung der Proben relativ zur Abstrich-DNA berechnet.

Aus der allgemeinen PCR-Gleichung (Formel 1) lässt sich die Grundgleichung der kinetischen PCR zur Quantifizierung der DNA-Ausgangsmenge ableiten (Formel 2). [Dr. rer. nat. Norman Häfner, 2008]

$$(1) \quad N_C = N_0 \cdot (E+1)^C \quad \rightarrow \quad (2) \quad N_0 = N_T / (E+1)^{C_T}$$

N_C = DNA Menge zum Zyklus C
 N_{CT} = DNA-Menge des Targets zum Zyklus C
 N_{CR} = DNA-Menge der Referenz zum Zyklus C
 N_T = DNA Menge bei Erreichen des Thresholds (Zyklus C_T)
 N_0 = Ausgangsmenge an DNA
 N_{OT} = Ausgangsmenge des Targets
 N_{OR} = Ausgangsmenge der Referenz
 E = PCR Effizienz

Die Formel 1 wurde für das Target (klinische Probe) und die Referenz (Abstrich-DNA) aufgestellt (siehe Formeln 3 und 4):

$$(3) \quad N_{OT} = N_{CT} / (E+1)^{C_{OT}}$$

$$(4) \quad N_{OR} = N_{CR} / (E+1)^{C_{OR}}$$

Die relative Methylierung (Formel 5) berechnet sich aus dem Quotienten der Gleichungen 3 und 4:

$$(5) \quad N_{OT} / N_{OR} = (N_{CT} / (E+1)^{C_{OT}}) / (N_{CR} / (E+1)^{C_{OR}}) \quad \rightarrow \quad (6) \quad \text{rel. Konz.} = 2^{C_{OR}} / 2^{C_{OT}} = 2^{C_{OR}-C_{OT}}$$

C_{OT} = C_t -Wert des Targets
 C_{OR} = C_t -Wert der Referenz

Die Formel 5 wurde vereinfacht und stellt die Berechnungsgrundlage für die relative Konzentration (Formel 6) dar. Die PCR-Effizienz wurde als optimal angenommen und einem Wert von 2 gleichgesetzt, das heißt es gilt $E+1=2$. Die 1 wird genutzt um die prozentuale Angabe der Effizienz zu berücksichtigen. Eine PCR-Effizienz von 100 % entspricht einem Wert

von 1 und dieser einem Vervielfältigungsfaktor von 2. Das bedeutet, dass sich jeder vorliegende DNA-Strang während eines Amplifikationszyklus verdoppelt (Optimum der PCR). Für die Abstrich-DNA liegt der C_t -Wert mit dem β -Aktin-Primer bei 32,14 und der C_t -Wert der methylierungsspezifischen Amplifikation bei 28,08. Die relative Konzentration der Abstrich-DNA (relativ zum Housekeeping-Gen β -Aktin) wird berechnet mithilfe der Formel 6 (siehe Berechnung 1).

Berechnung 1: relative Konzentration (Abstrich-DNA) = $2^{C_t(\text{FoxP3M}) - C_t(\beta\text{-Aktin})}$

Für die Abstrich-DNA liegt der Wert für die relative Konzentration bei 0,059954007.

Die relative Methylierung von FoxP3 in den klinischen Proben wurde ebenfalls auf der Grundlage der Angaben aus Formel 6 berechnet. Dabei wurde der Quotient aus der relativen Konzentration der Abstrich-DNA und der klinischen Probe bestimmt (siehe Berechnung 2). Die Methylierung wurde relativ zur Menge an Amplifikat mit dem β -Aktin-Primer ermittelt. Um die errechneten Daten besser miteinander vergleichen zu können, wurde die relative Methylierung prozentual angegeben und dafür mit dem Faktor 100 multipliziert (siehe Berechnung 2).

Berechnung 2:

relative Meth. = $100 * (2^{C_t \text{ FoxP3M (Abstrich)}} - 2^{C_t \beta\text{-Aktin (Abstrich)}}) / (2^{C_t \text{ FoxP3M (Probe)}} - 2^{C_t \beta\text{-Aktin(Probe)}})$

Die nach den Berechnungsgrundlagen ausgewerteten Daten sind im Anhang in Tabelle 61 dargestellt. Der Großteil der Zellen weist bezüglich des untersuchten Genabschnittes eine Methylierung auf, was die errechneten Daten der relativen Methylierung bestätigen – im Mittel liegt eine 100%-ige Methylierung in den Proben vor. Der Median der relativen Methylierung von FoxP3 liegt bei 99,3%. Diese Zahl bestätigt außerdem, dass in den Proben mithilfe immunhistochemischer Färbungen wenige FoxP3-positive Zellen (regulatorische T-Zellen) angefärbt wurden und somit nahezu alle Zellen eine Methylierung von FoxP3 aufweisen sollten.

Aufgrund von Schwankungen der Methode ist es nicht möglich bei einer weniger als 100%-ig methylierten Probe auf die Zahl der FoxP3-positiven zu schließen.

Die Abstrich-Probe diente als Referenz, zu der alle Proben in Verhältnis gebracht wurden. Diese DNA-Probe verfügt über eine vollständige Methylierung in dem untersuchten Genabschnitt, sodass diese Probe als 100 % methyliert angenommen wurde. Die C_t -Werte für β -Aktin und für die methylierungsspezifische qPCR sollten idealerweise übereinstimmen, aber

es wurde eine Abweichung von ca. 4 C_t -Werten bestimmt. Dies kann mit einer unterschiedlichen PCR-Effizienz der beiden PCRs erklärt werden.

Einige ausgewählte Proben, die mit methylierungsspezifischem Primer vervielfältigt wurden, sind auf ein 2%-iges Agarosegel aufgetragen worden (siehe Abbildung 46). Das Auswahlkriterium basiert auf dem Auftreten eines unspezifischen Peaks in der Schmelzkurve der Probe. Die Banden des spezifischen Produktes laufen bei einer DNA-Größe von 200 bp. In den einzelnen Proben sind während der Amplifikation kleine Mengen Primer-Dimere entstanden, welche die PCR nicht stören.

Insgesamt bestätigen die Methylierungsdaten die IHC-Ergebnisse insofern, dass die Tumorgewebe sehr wenige FoxP3-positive beinhalten. Die meisten Zellen zeigen einen methylierten FoxP3- Promotor (Tumor-, Stromazellen).

Auswertung nicht-methylierungsspezifische qPCR

Die nicht-methylierungsspezifische qPCR ist nicht sensitiv genug, um die klinischen Proben zu bewerten, da während der PCR eine große Menge Primer-Dimere gebildet wurde, welche die PCR stören. Die Ergebnisse der Nicht-Methylierung konnten nur aus dem Agarosegel (siehe Abbildung 46) abgeschätzt werden und nicht wie bei der methylierungsspezifischen qPCR mithilfe der C_t -Werte berechnet werden.

Die Banden des spezifischen Produktes laufen bei einer DNA-Größe von 200 bp und das unspezifische Produkt bei unterhalb von 75 bp.

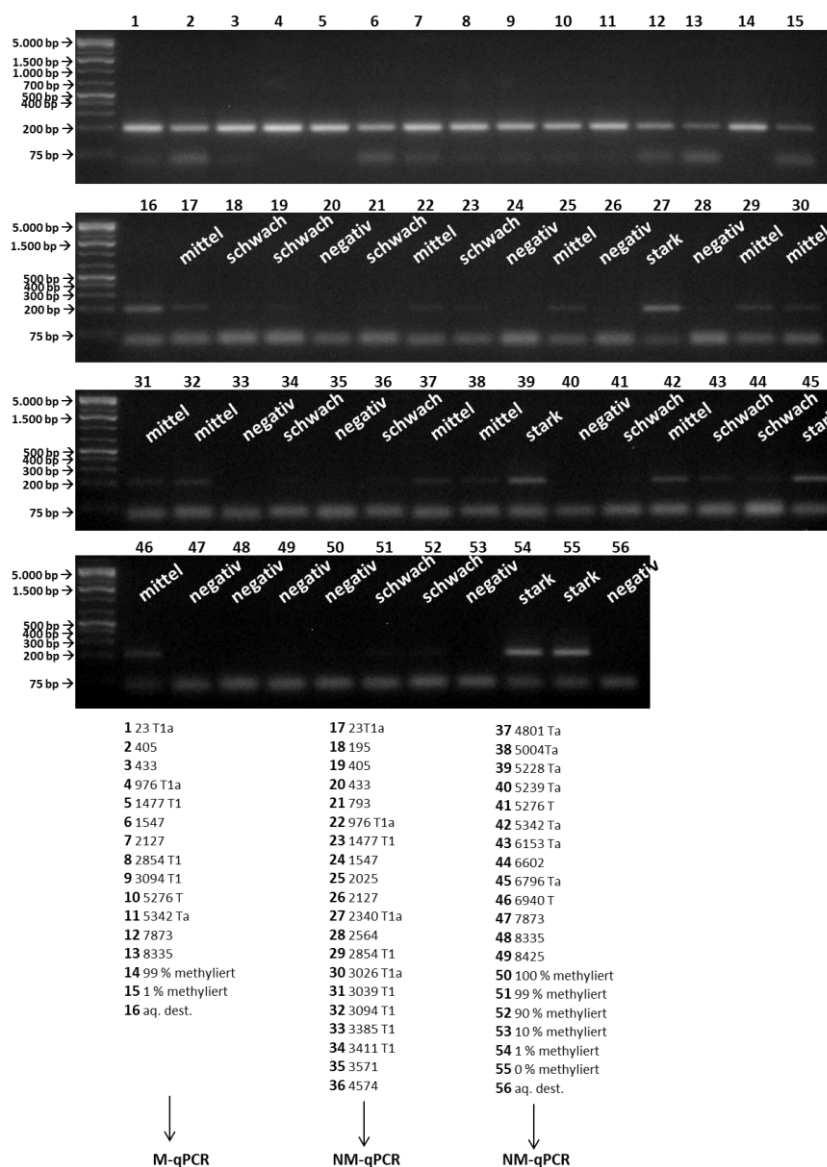


Abbildung 46 Agarose-Gelbild der NM-qPCR (klinische Proben)

Die Nachweisgrenze für die nicht-methylierungsspezifische qPCR lag bei 1% methylierter DNA, das heißt es konnten 20 Abstrich-DNA-Kopien aus einem Hintergrund von 2.000 Plasmid-Kopien nachgewiesen werden, was einem prozentualen Anteil von 1 % entspricht.

Die Menge an amplifiziertem spezifischem Produkt (obere Bande) wurde für die 32 untersuchten Proben aus dem Agarosegel beurteilt und in vier Gruppen eingeteilt – stark, mittel, schwach, negativ. Die Zuordnung der Ergebnisse der nicht-methylierungsspezifischen qPCR zu einer der vier Gruppen ist in Tabelle 61 im Anhang dargestellt. Umso stärker die Bande im Gel ist, desto mehr wurde mit dem nicht-methylierungsspezifischen Primer amplifiziert und desto mehr DNA lag innerhalb der Probe unmethyliert vor.

Die vier Gruppen stark, mittel, schwach und negativ wurden wiederum zu zwei Gruppen zusammengefasst: stark/mittel sowie schwach/negativ und die Fälle nach dem AAK-Status ausgezählt. Mithilfe des χ^2 -Tests wurden die beiden AAK-Status bezüglich der Stärke der Banden auf statistisch signifikante Unterscheidung oder Gleichheit in Excel mittels des χ^2 -Tests und des Fisher's-Exact-Tests ausgewertet.

Tabelle 48 gibt die ausgezählten Fälle differenziert nach AAK-positiv und -negativ in einer Kreuztabelle wieder.

Tabelle 48 Kreuztabelle: Menge unmethylierter DNA u. AAK-Status
Stärke der Agarosegel-Banden/
Menge an unmethylierter DNA

| AAK-Status | | stark/mittel | schwach/negativ | |
|------------|---|--------------|-----------------|----|
| | + | 3 | 6 | 9 |
| | - | 10 | 13 | 23 |
| | | 13 | 19 | 32 |

Die für die beiden Tests erhaltenen Daten sind in Tabelle 49 dargestellt.

Tabelle 49 Ergebnisse χ^2 -Test und Fisher's Exact Test

| Test | Wert der Prüfgröße/Wahrscheinlichkeit |
|----------------------|---------------------------------------|
| χ^2 | 0,276 |
| Fischer's Exact Test | 0,7035873 |

Die Wahrscheinlichkeiten zu den jeweiligen Werten der χ^2 -Prüfgröße sind in Tabelle 50 aufgeführt. Diese Wahrscheinlichkeit gibt an, dass kein statistischer Zusammenhang zwischen den untersuchten Parametern vorliegt.

Tabelle 50 Wahrscheinlichkeiten der χ^2 -Prüfgrößen

| alpha | 0,1 | 0,05 | 0,025 | 0,01 | 0,005 |
|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| χ^2 (>) | 2,706 | 3,841 | 5,024 | 6,635 | 7,879 |

Die Prüfgröße des χ^2 -Tests für den Zusammenhang zwischen der Stärke der Banden und dem vorliegenden AAK-Status liegt bei 0,276 und damit oberhalb der kritischen Grenze für $\alpha = 0,05$. Der genaue Wert für die Wahrscheinlichkeit p ist größer als 0,1 ($\alpha > 0,1$). Der getestete Zusammenhang ist statistisch nicht signifikant, da die Prüfgröße für den χ^2 -Test einen p -Wert größer als 0,05 annimmt. Der Nullhypothese (H_0 : Die getesteten Größen sind statistisch unabhängig.) kann zugestimmt werden. Mit einer Wahrscheinlichkeit von unter 5 % sind die

beiden getesteten Größen (Menge an unmethylierter DNA und AAK-Status) statistisch abhängig.

Der Fisher's Exact Test gibt direkt die Wahrscheinlichkeit (p-Wert) für das Zutreffen der Nullhypothese wieder. Die Nullhypothese (H_0) besagt, dass es keinen statistischen Zusammenhang zwischen dem AAK-Status und der Menge an unmethylierter DNA (Stärke der Banden) gibt. Der Fisher's Exact-Test gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der die Menge an unmethylierter DNA (Stärke der Gelbanden) und der AAK-Status nicht korrelieren. Für den getesteten Zusammenhang bedeutet das: zwischen Stärke der Gelbanden und AAK-Status liegt mit einer Wahrscheinlichkeit von 70,4 % kein statistisch signifikanter Zusammenhang vor.

Eine weitere Einteilungsmöglichkeit der vier Gruppen (stark, mittel, schwach, negativ) ist in „positiv“ und „negativ“. Dazu werden die drei Gruppen stark, mittel und schwach zu „positiv“ zusammengefasst und der Gruppe „negativ“, in der man bei der Auswertung keine Bande verzeichnet hat, gegenüber gestellt. Die Proben mit positivem und negativem AAK wurden in den beiden Gruppen ausgezählt und in einer Kreuztabelle dargestellt. Die Daten wurden mittels χ^2 -Test und Fisher's-Exact-Test auf einen statistisch signifikanten Zusammenhang untersucht und in Excel ausgewertet.

Tabelle 51 Kreuztabelle: Menge unmethylierter DNA u. AAK-Status
Stärke der Agarosegel-Banden/ Menge
an unmethylierter DNA

| AAK-Status | | positiv | negativ | |
|------------|----------|----------------|----------------|----|
| | + | 4 | 5 | 9 |
| | - | 18 | 5 | 23 |
| | | 22 | 10 | 32 |

Die für die beiden Tests erhaltenen Daten sind in Tabelle 52 dargestellt.

Tabelle 52 Ergebnisse χ^2 -Test und Fisher's Exact Test

| Test | Wert der Prüfgröße/Wahrscheinlichkeit |
|---------------------|--|
| χ^2 | 3,443 |
| Fisher's Exact Test | 0,0960084 |

Die Wahrscheinlichkeiten zu den jeweiligen Werten der χ^2 -Prüfgröße sind in Tabelle 53 aufgeführt. Diese Wahrscheinlichkeit gibt an, dass kein statistischer Zusammenhang zwischen den untersuchten Parametern vorliegt.

Tabelle 53 Wahrscheinlichkeiten der χ^2 -Prüfgrößen

| alpha | 0,1 | 0,05 | 0,025 | 0,01 | 0,005 |
|-----------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| χ^2 (>) | 2,706 | 3,841 | 5,024 | 6,635 | 7,879 |

Die Prüfgröße des χ^2 -Tests für den Zusammenhang zwischen der Stärke der Banden und dem vorliegenden AAK-Status liegt bei 3,443 und demzufolge knapp oberhalb der kritischen Grenze

für $\alpha = 0,05$ ($\alpha > 0,05$). Der getestete Zusammenhang ist statistisch nicht signifikant, da die Prüfgröße für den Chi²-Test einen p-Wert größer als 0,05 annimmt. Das bedeutet der getestete Zusammenhang zwischen Bandenstärke und AAK-Status ist statistisch nicht signifikant. Der Nullhypothese (H_0 : Die getesteten Größen sind statistisch unabhängig.) kann zugestimmt werden. Mit einer Wahrscheinlichkeit von unter 5 % sind die beiden getesteten Größen (Stärke der Banden und AAK-Status) statistisch abhängig und mit einer 95%-igen Wahrscheinlichkeit unabhängig.

Der Fisher's Exact Test stellt eine direkte Wahrscheinlichkeit (p-Wert) für das Zutreffen der Nullhypothese dar. Die Nullhypothese (H_0) besagt, dass es keinen statistischen Zusammenhang zwischen den getesteten Größen gibt. Der Fisher's Exact-Test gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der die Stärke der Banden im Gel und der AAK-Status nicht korrelieren. Das bedeutet mit einer Wahrscheinlichkeit von 9,6 % existiert zwischen Bandenstärke und AAK-Status keine Korrelation.

Es liegt kein statistischer Zusammenhang zwischen der Bandenstärke, das heißt der Menge an unmethylierter DNA, und dem AAK-Status vor. Anhand des Grades der Methylierung kann daher nicht auf den AAK-Status geschlossen werden. Dieses Ergebnis bestätigt die IHC-Daten, aus denen ebenfalls hervorgeht, dass kein Zusammenhang zwischen der Anzahl der FoxP3-positiven Zellen im Tumor oder im Stroma und dem AAK-Status vorliegt.

5.3 Validierung IHC-Daten – Genexpressionsanalyse CD8-Antigen

Die Daten aus der immunhistochemischen Färbung der zytotoxischen T-Zellen (CD8) wurden mittels Genexpressionsanalysen validiert. Die Validierung erfolgte aus der Motivation heraus, dass eine statistische Signifikanz zwischen der Zahl CD8-positiver Zellen im Tumorgewebe und dem vorliegenden AAK-Status gefunden wurde. Zwischen den Parametern CD8-positive Zellen im Tumor und dem AAK-Status wurde bei der immunhistochemischen Analyse eine statistische Korrelation bestimmt.

Die CD8-Genexpressionsanalyse wurde anhand von 46 klinischen Proben (liegen bereits immunhistochemische Daten vor) bestimmt. Zur Analyse der Genexpression des CD8-Antigens wurde aus den Ovarialkarzinom-Geweben (klinische Proben) RNA isoliert und aufgereinigt, welche mittels Reverser Transkription durch das Enzym Reverse Transkriptase in cDNA (complementary DNA) umgeschrieben wurde. Dafür wurden 10 µm dicke Gefrierschnitte mit dem Gefriermikrotom geschnitten und 12 dieser Schnitte (Größe eines 1 cent- bzw. 2 cent-Stücks) mit einem maximalen Gewicht von 30 mg in die RNA-Isolation eingesetzt.

Menge und Reinheit der RNA wurden mit dem NanoDrop vermessen. Als Referenzwert (Blank-Wert) diente Nuklease-freies Wasser, in dem die isolierte und aufgereinigte RNA gelöst vorlag. Die Amplifikation der cDNA in einer qPCR mithilfe von CD8-Forward- und CD8-Reverse-Primer ermöglichte eine Quantifizierung der in den einzelnen Gewebeproben enthaltenen cDNA des CD8-Gens. Die Sequenzdaten zum CD8-Target und zu dem verwendeten Primerpaar sind dem Anhang zu entnehmen. Die Menge an cDNA ist dem Anteil an RNA äquivalent, sodass eine Einschätzung über die Genexpression des CD8-Antigens getroffen werden kann.

Als Positivkontrolle für die Genexpressionsanalyse des CD8-Genabschnitts mittels der qPCR wurden CD8-positive Zellen aus Blut isoliert und als Negativkontrollen dienten CD8-negative Zellen aus Blut, Zellen einer Ovarialkarzinom-Zelllinie (SKOV3-Zelllinie) sowie aqua dest.. Aus den Zellen wurde die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben (Reverse Transkription), die in die qPCR als Kontrollproben eingesetzt werden konnten.

Die CD8-positiven und CD8-negativen Zellen, welche aus der FACS-Analyse gewonnen wurden, umfassen eine Anzahl von 240.478 und 552.419 Zellen. Im letzten Schritt der Zell-Sortierung liegen CD3-positive und CD45-positive Zellen vor, welche zusammen die Menge aller T-Lymphozyten darstellen, die nochmal einer Selektion nach CD8+ und CD8- unterzogen werden müssen. Mit Hilfe der weiteren CD8-Färbung konnten die zytotoxischen CD8+ T-Zellen von CD4+/CD8- T-Helferzellen unterschieden werden.

Aus diesen Zellen wurde die RNA isoliert und diese mittels dem Enzym Reverse Transkriptase in eine cDNA umgeschrieben (Reverse Transkription; qRT-PCR).

In die Reverse Transkription wurde 1 µg der RNA-Proben aus CD8-positiven bzw. CD8-negativen Zellen sowie aus der SKOV3-Zelllinie (HTB) eingesetzt. Konzentrationen und Volumina der Kontrollen sowie die Mengen an zugegebenem Wasser, um die RNA-Proben in die Reverse Transkription einzusetzen, sind jeweils aus Tabelle 54 zu entnehmen.

Tabelle 54 Konzentrationen u. Volumina der Kontrollen, Menge aqua dest. Reverse Transkription

| Kontrolle | Konzentration (ng/µL) | Volumen (µL) | Volumen H ₂ O (µL) |
|---------------------------------|-----------------------|--------------|-------------------------------|
| CD8-negativ | 7,68 | 4,63 | 5,87 |
| CD8-positiv | 3,39 | 10,50 | - |
| SKOV3 (HTB1) | 330 | 3,00 | 7,50 |
| SKOV3 → 1:10-verdünnt (HTB2) | 33 | 1,3 | 9,1 |

Die Parameter der Genexpressionsanalyse an den klinischen Proben wurden optimiert. Dabei wurden das CD8-Primerpaar auf dessen Spezifität überprüft, verschiedene Annealing-Temperaturen ausgetestet sowie eine Verdünnungsreihe aus CD8-positiver und CD8-negativer cDNA hergestellt.

5.3.1 Überprüfung der Primerspezifität

Die Primerspezifität des CD8-Primerpaares wurde an CD8⁺-cDNA, CD8⁻-cDNA, HTB1-cDNA, HTB2-cDNA, cDNA einer klinischen Probe (8265), cDNA aus einer Ovarialkarzinom-Zelllinie (A2780) und an aqua dest. (Negativkontrolle) überprüft. Die Amplifikation wurde mit dem Real-Time-Gerät ABI7300 und einer Annealing-Temperatur von 60 °C sowie einer Elongationsdauer von 40 Sekunden bei 72°C realisiert. Die Ergebnisse aus der qPCR sind in Abbildung 47 dargestellt.

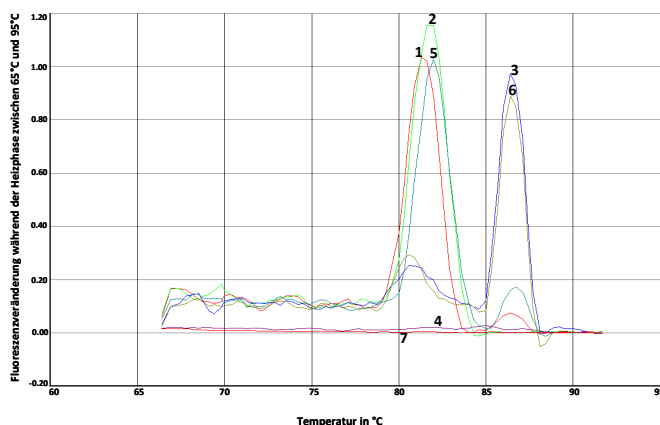


Abbildung 47 Schmelzkurve: Amplifikation mit CD8-Primerpaar

1 CD8-positiv; 2 CD8-negativ; 3 HTB (1 µg eingesetzt); 4 HTB (1:10-Verdünnung → 30 ng eingesetzt); 5 klinische Probe (8265); 6 OvCa-Zelllinie (A2780); 7 aqua dest.

Die kleineren Peaks deuten darauf hin, dass neben dem spezifischen Produkt unspezifisch Primer-Dimere entstanden sind. Das verwendete CD8-Primerpaar ist spezifisch genug um das Target zu amplifizieren. In der Wasserkontrolle (Abbildung 47 Kurve 7) wurde weder spezifisch noch unspezifisch ein Produkt gebildet. SKOV3- Zellen exprimieren kein CD8, sodass die Probe sich negativ verhält. Die Gesamt-cDNA Menge war ausreichend, da das Housekeeping-Gen amplifiziert wurde

war zu niedrig, sodass kein Produkt amplifiziert wurde (siehe Abbildung 47 Kurve 4). Die Proben wurden für eine nähere Analyse auf ein 2%-iges Agarosegel aufgetragen (Abbildung 48).

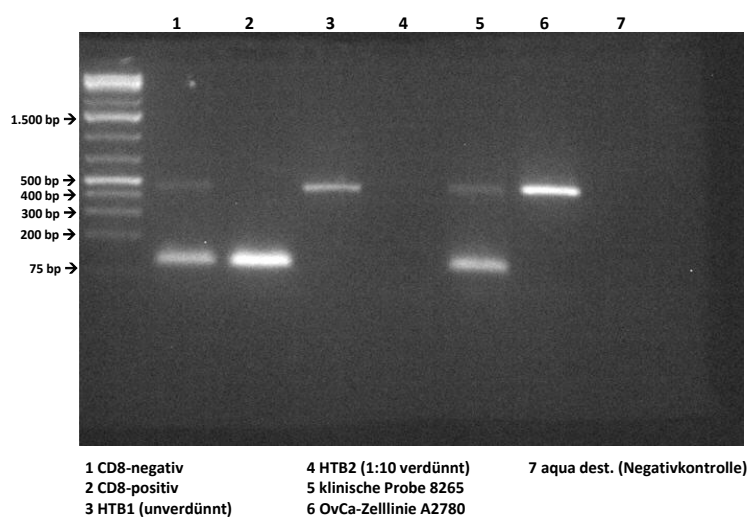


Abbildung 48 Agarose-Gelbild: Genexpressionsanalyse Austesten der Primer-Spezifität

Die spezifischen PCR-Produkte laufen bei einer Größe von ungefähr 100 bp, das heißt das kleinere Produkt ist das spezifische Amplifikat. Das Produkt, welches bei einer Fragment-Größe von 500 bp läuft, wurde unspezifisch gebildet. In den Proben der CD8⁺-cDNA, der CD8⁻-cDNA und der klinischen Probe (8265) wurde die größte Menge an spezifischem Produkt gebildet. In der CD8-negativen und der klinischen Probe sind neben dem spezifischen auch unspezifische Amplifikate entstanden. In der unverdünnten HTB-Probe wurde ausschließlich das unspezifische Produkt amplifiziert. Die 1:10 verdünnte HTB-Probe zeigte keine Banden, sodass während der PCR weder spezifisch noch unspezifisch Produkte gebildet wurden. Das unspezifisch amplifizierte Produkt ist durch das Einsetzen von weniger Target in der verdünnten gegenüber der unverdünnten HTB-Probe verschwunden. Die cDNA der OvCa-Zelllinie A2780 zeigte ausschließlich das unspezifische Produkt, das heißt die DNA wurde unspezifisch amplifiziert. In der Wasserkontrolle wurden keine gebildeten Produkte aufgetrennt. Die C_t-Werte der Proben, in denen eine größere Menge des unspezifischen Produkts gebildet wurde, liegen höher als Proben mit weniger unspezifischen Amplifikats.

Als Referenz zur PCR mit dem CD8-Primerpaar wurde das Housekeeping-Gen GAPDH3' amplifiziert (siehe Abbildung 49).

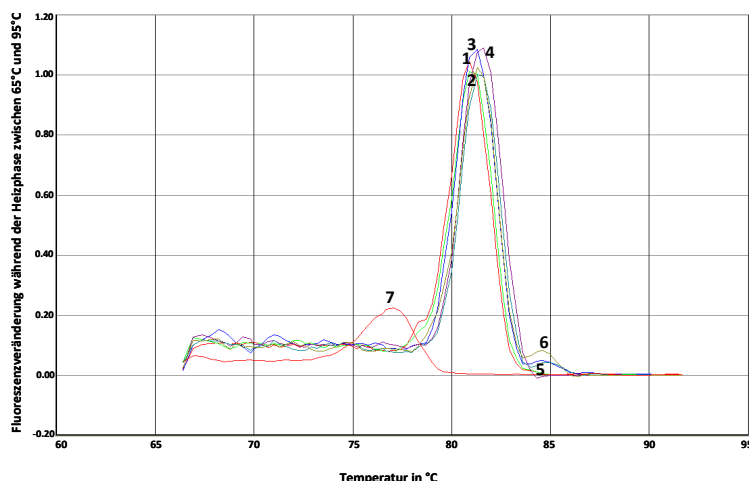


Abbildung 49 Schmelzkurve: Amplifikation mit dem GAPDH3'-Primerpaar
 1 CD8-positiv (rot); 2 CD8-negativ (grün); 3 HTB 1 µg eingesetzt (dunkelblau); 4 HTB 1:10-Verdünnung → 30 ng eingesetzt (lila); 5 klinische Probe 8265 (hellblau); 6 OvCa-Zelllinie A2780 (dunkelgrün); 7 aqua dest. (rot)

Alle Proben zeigen eine spezifische Amplifikation des spezifischen Produkts. Das Primerpaar, das für die Genexpression genutzt wurde, zeigte Spezifität gegenüber dem gewünschten CD8-Target, das heißt die Primer amplifizieren die Exonbereiche der cDNA des CD8-Gens spezifisch.

Bei der Amplifikation der unverdünnten HTB-Probe und der cDNA der OvCa-Zelllinie ist die Bildung eines unspezifischen Produkts zu erkennen. Die unspezifische Amplifikation ist durch einen im Gegensatz zum spezifischen Produkt niedrigen Peak charakterisiert (siehe Abbildung 49, rechte Bildhälfte). Für die Quantifizierung ist das Nebenprodukt zu vernachlässigen. Bei dem entstandenen Peak in der Wasserkontrolle handelt es sich nicht um das spezifische Produkt, sondern um unspezifische Primer-Dimere.

5.3.2 Austesten verschiedener Annealing-Temperaturen

Für das Austesten verschiedener Annealing-Temperaturen wurde eine Gradienten-PCR in einem herkömmlichen PCR-Cycler von Eppendorf durchgeführt. An dem Gerät wurde ein Gradient von $62^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$ eingestellt. Die während des Annealing-Prozesses ausgetesteten Temperaturen umfassten 58°C ; 60°C ; 62°C ; $63,5^{\circ}\text{C}$ und $65,4^{\circ}\text{C}$.

In die PCR wurden Wasser als Negativkontrolle, cDNA einer klinischen Probe einer OvCa-Patientin (8265) und cDNA der OvCa-Zelllinie A2780 eingesetzt.

Die Schmelzkurven der einzelnen Temperaturen aus der Gradienten-PCR sind im Anhang dargestellt (Abbildungen 75 bis 79). In diesen Kurven ist zu erkennen, dass die Amplifikation

der cDNA aus der klinischen Probe 8265 über den gesamten getesteten Temperaturbereich ein spezifisches Amplifikationsprodukt bei einer Schmelztemperatur von ungefähr 81,5°C zeigte. Außerdem sind bei einer Temperatur von 58°C aus der Schmelzkurve Primer-Dimere erkennbar, deren Menge mit steigender Annealing-Temperatur abnahm und bei 62°C vollständig verschwunden war. In der Wasserkontrolle wurde bei keiner der getesteten Temperaturen weder ein spezifisches noch ein unspezifisches Produkt amplifiziert. Die cDNA der OvCa-Zelllinie A2780 zeigte bei keiner der ausgetesteten Annealing-Temperaturen ein spezifisches Produkt, sondern ausschließlich amplifizierte Primer-Dimere. Die Menge des unspezifischen Produkts sank mit steigender Annealing-Temperatur und war bei einer Temperatur von 63,5°C vollständig verschwunden.

Die mit verschiedenen Annealing-Temperaturen amplifizierten klinischen Proben wurden außerdem auf ein 2%-iges Agarosegel aufgetragen (siehe Abbildung 50).

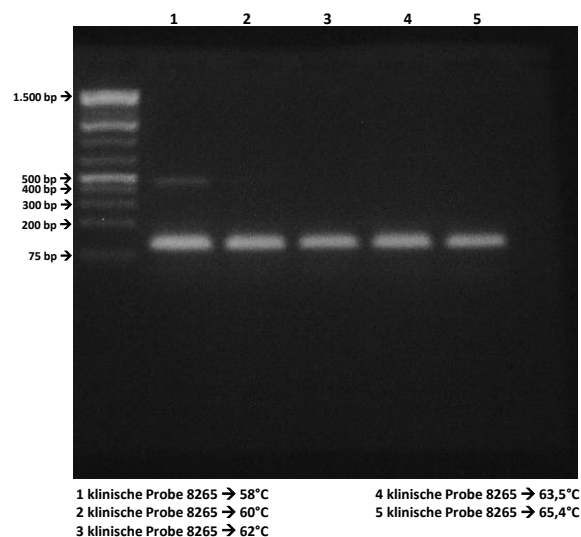


Abbildung 50 Agarose-Gelbild: Genexpressionsanalyse Austesten verschiedener Annealing-Temperaturen

Das spezifische Amplifikat läuft bei einer Größe von ungefähr 75 bp und unspezifische Produkte bei ungefähr 500 bp. Die Auftrennung der DNA im Agarosegel zeigte, dass über alle Temperaturen eine nahezu konstant große Menge an spezifischem Produkt gebildet wurde. Die Menge des spezifischen Produktes nimmt nur sehr leicht ab, was aus der Intensität der Banden im Agarosegel und der Höhe der Peaks in den Schmelzkurven erkennbar ist. Ausschließlich bei der niedrigsten Temperatur von 58°C wurden unspezifische Produkte gebildet, was aus den analysierten Schmelzkurven bereits hervorging.

Für die klinischen Proben wurde eine Annealing-Temperatur von 62°C festgelegt, da bei einer niedrigeren Temperatur die Menge an Primer-Dimeren steigt (Vergleich Schmelzkurve cDNA der OvCa-Zelllinie) und bei einer höheren Temperatur (Vergleich Gelbild klinische Probe 8265) die Quantität an spezifischem Produkt sank.

5.3.3 Genexpressionsanalyse an den klinischen Proben

Für eine verbesserte Auswertung der Daten aus der Genexpressionsanalyse der klinischen Proben wurde eine Standardreihe (Verdünnungsreihe) hergestellt, welche allerdings bei der Auswertung nicht berücksichtigt wurde. Diese enthielt als Referenz bekannte Konzentrationen aus CD8-positiver cDNA (CD8-positive T-Lymphozyten) und CD8-negativer cDNA (SKOV3-OvCa-Zelllinie).

Als Referenzwerte für die Genexpression der klinischen Proben wurde eine Standardreihe (Verdünnungsreihe) in der qPCR mitgeführt. Die Motivation aus der die Verdünnungsreihe mitgeführt wurde, war eine Ableitung der Expressionshöhe des GOI (Teil des CD8-Gens). Die cDNA-Proben CD8-positiver Zellen und CD8-negativer SKOV3-Zellen wurden in bestimmten Verhältnissen ineinander verdünnt. Es wurden sechs Standard-Kontrollen generiert und in die qPCR eingesetzt. Die Menge an CD8-positiver cDNA und CD8-negativer cDNA in der jeweiligen Probenlösung wurde anhand der C_t -Werte aus einer vorangegangenen Test-PCR berechnet. In diesem Test wurde das Verhalten der Verdünnungsreihe untersucht. Die C_t -Werte der CD8-positiven cDNA und der HTB-cDNA wurden für den CD8-Primer und den GAPDH3'-Primer erfasst. Die C_t -Werte der beiden Proben unterschieden sich bei der Amplifikation mit dem Primer für das Housekeeping-Gen um einen Wert von mehr als 8 Zyklen, was einer 256-fachen Überkonzentration der HTB-cDNA bezüglich der CD8-positiven cDNA entsprach.

In Vorbereitung auf die Herstellung der Standardreihe musste die unverdünnte cDNA-Lösung HTB mit einer Konzentration von 330 ng/ μ L 1:20 in aqua dest. verdünnt werden um eine Arbeitskonzentration von 16,5 ng/ μ L zu generieren. Bei der Herstellung der Verdünnungsreihe wurde die CD8-negative cDNA (HTB) nochmal 1:10 in der CD8-positiven cDNA verdünnt um eine Endkonzentration von 1,65 ng/ μ L sowie eine Gesamt-Verdünnung von 1:200 zu erreichen. Die in die einzelnen Verdünnungsstufen eingesetzten Verdünnungen der CD8-positiven und CD8-negativen cDNA sind der Tabelle 55 zu entnehmen.

Tabelle 55 Verdünnungen CD8+ und CD8- cDNA

| cDNA-Probe | Ausgangskonzentration | Verdünnung | Endkonzentration |
|------------------------------|------------------------------|-------------------|-------------------------|
| HTB (SKOV3-Zelllinie) | 330 ng/ μ L | 1:200 | 1,65 ng/ μ L |
| CD8-positiv | 3,39 ng/ μ L | unverdünnt | 3,39 ng/ μ L |
| | | 1:10 | 0,339 ng/ μ L |
| | | 1:100 | 0,0339 ng/ μ L |
| | | 1:1000 | 0,00339 ng/ μ L |
| | | 1:10.000 | 0,000339 ng/ μ L |

Die Standardreihe wurde nach den Angaben aus Tabelle 56 generiert. Die einzelnen Verdünnungen der CD8-positiven cDNA wurden in einer seriellen Verdünnung aus dem vorangegangenen Verdünnungsschritt hergestellt.

Tabelle 56 Standardreihe für Genexpressionsanalyse

| Kontrolle | Vol. CD8 ⁺ - cDNA (μ L) | Konz. CD8 ⁺ -cDNA (ng/ μ L) | Verd. CD8 ⁺ -cDNA | Vol. HTB-cDNA (μ L) | Konz. HTB- cDNA (ng/ μ L) | Verd. HTB- cDNA | H ₂ O (μ L) | Σ (μ L) |
|-----------|--|--|---------------------------------|--------------------------------|--|-----------------------|--------------------------------|------------------------|
| I | - | - | - | 1 | 1,65 | 1:200 | 9 | 10 |
| II | - | 3,39 | unverdünnt | - | - | - | - | - |
| III | 1 | 0,339 | 1:10 | 1 | 1,65 | 1:200 | 8 | 10 |
| IV | 1 | 0,0339 | 1:100 | 1 | 1,65 | 1:200 | 8 | 10 |
| V | 1 | 0,00339 | 1:1000 | 1 | 1,65 | 1:200 | 8 | 10 |
| VI | 1 | 0,000339 | 1:10.000 | 1 | 1,65 | 1:200 | 8 | 10 |

Es wurde 1 μ L des jeweiligen Verdünnungsschrittes (Kontrollen) sowie der klinischen Proben in die qPCR eingesetzt und mittels CD8-Primerpaar amplifiziert.

Als Referenz für die Daten aus der CD8-Amplifikation, müssen alle Proben und Kontrollen mit dem Primer für das Haushaltsgen (housekeeping gene) GAPDH 3' amplifiziert werden. Bei der Ermittlung des Genexpressionsniveaus in den Proben musste die Menge an RNA beachtet werden, die aus den Zellen isoliert wurde. Diese Menge unterscheidet sich zwischen den einzelnen untersuchten Kontrollproben und in den klinischen Proben. GAPDH ist ein Housekeeping-Gen, d. h. es wird in jeder Zelle unreguliert (konstitutiv) exprimiert.

Das GAPDH-Haushaltsgen kodiert für Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und ist eines der am weitesten verbreiteten Housekeeping-Gene, die für den Vergleich von Expressionsdaten genutzt werden. [Barber RD et al., 2005] Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase ist ein Enzym des Glykolyse-Stoffwechsel, welches die Umwandlung von Glycerinaldehyd-3-Phosphat mithilfe von NAD⁺ zu 1,3-Bisphosphoglycerat katalysiert. [URL-54]

Die Ergebnisse der qPCR sind in Abbildung 51 dargestellt und stellen Amplifikationsplots dar.

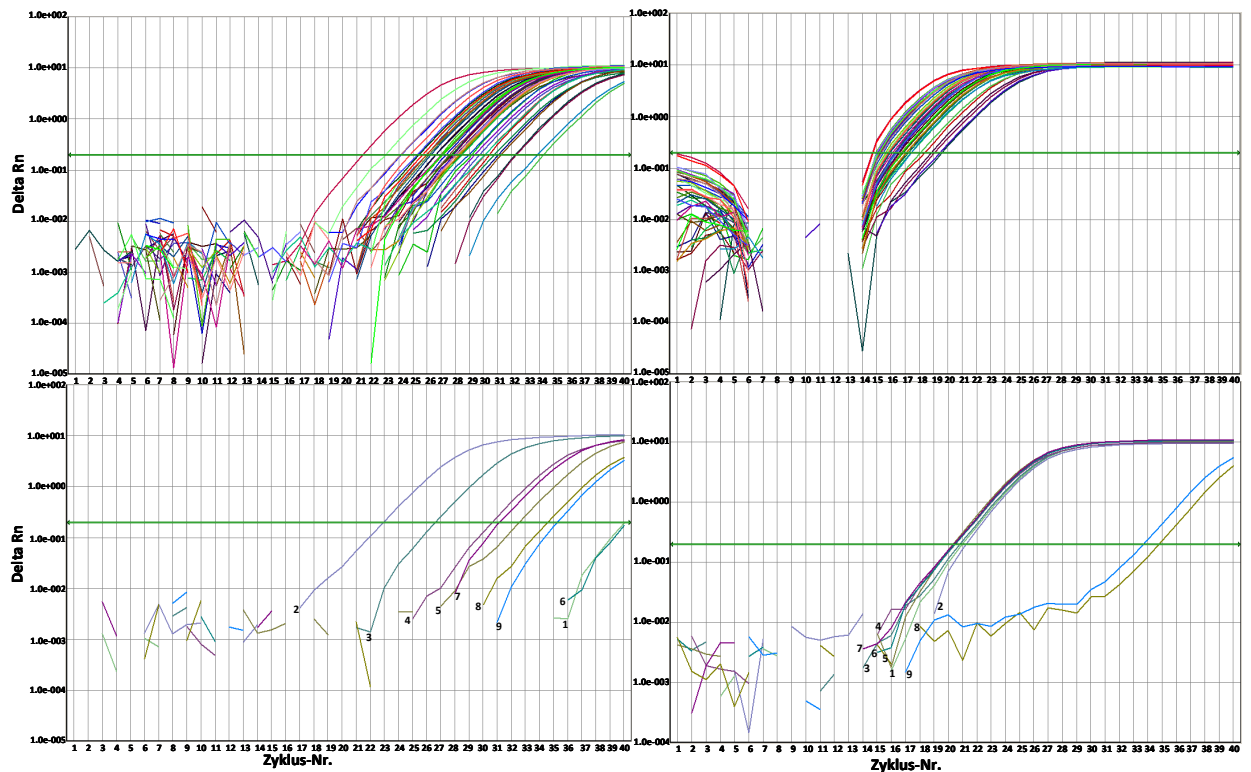


Abbildung 51 Amplifikationsplot: klinische Proben Genexpressionsdaten

links oben: klinische Proben CD8; rechts oben: klinische Proben GAPDH 3'

links unten: Kontrollen CD8; rechts unten: Kontrollen GAPDH 3' (1 HTB 1:200; 2 CD8+ unverdünnt; 3 CD8+ 1:10; 4 CD8+ 1:100; 5 CD8 + 1:1000; 6 CD8 + 1:10.000; 7 CD8-; 8 aqua dest.; 9 aqua dest.)

Die Expressionsdaten sind getrennt nach Amplifikation des GOI (Genabschnitt des CD8-Antigens) und der des Housekeeping-Gens (GAPDH3) dargestellt. Die Kontrollen wurden getrennt von den klinischen Proben in eigenen Diagrammen für GOI-Amplifikation und PCR mithilfe des Primers für das Housekeeping-Gen aufgeführt.

Der Assay weist eine Sensitivität von 1 CD8-positive Zelle unter 1.000 Zellen auf, d. h. 1 CD8-positive Zelle wird in einem Hintergrund von 1000 Zellen detektiert.

Die x-Achse der Diagramme stellt die Fluoreszenzänderung während der qPCR dar (*Delta Rn*) und die y-Achse charakterisiert die während der qPCR durchlaufenen Zyklen (Zyklus-Zahl 40). Das im unteren Bereich des Diagramms erkennbare Rauschen wurde durch Hintergrundsignale hervorgerufen, welche die gemessenen Daten der klinischen Proben nicht beeinflussen.

Die waagerechte grüne Linie gilt als Schwellwert (threshold), bei dem der initiale Punkt des exponentiellen Wachstums der Kurven und damit der Fluoreszenzänderung (*Delta Rn*) liegt. Als Auswertungskriterium für die qPCR diene der Zeitpunkt (Zyklusnummer), bei dem die gemessene Fluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant und stetig überschreitet (engl.

cycle threshold C_t), das heißt bei dem der exponentielle Anstieg des Fluoreszenzsignals beginnt. Dieser als C_t bezeichnete Wert wurde zur Quantifizierung der cDNA-Moleküle herangezogen, die bei der qPCR gebildet wurden. Umso größer die Menge cDNA in einer Probenlösung vor der Amplifikation war, desto mehr Kopien sind während der PCR entstanden und desto schneller wurde ein Fluoreszenzsignal generiert. Das bedeutet wiederum, dass die Fluoreszenz den Schwellwert in einem früheren Zyklus übersteigt und der C_t -Wert umso niedriger ist. Die C_t -Werte der einzelnen Proben wurden miteinander verglichen. Als Voraussetzung für diesen Vergleich mussten die Amplifikationen mit der gleichen Effizienz erfolgt sein.

Die C_t -Werte für die Amplifikation von CD8 und GAPDH3' sind für die einzelnen Proben in Tabelle 62 aufgeführt.

Die relative Konzentration an cDNA wurde für jede Probe nach Formel 6 (siehe Methylierungsanalyse) berechnet.

$$\text{relative Konzentration} = 2^{C_{tR}} / 2^{C_{tT}} = 2^{|C_{tR} - C_{tT}|}$$

C_{tT} = C_t -Wert des Targets (CD8)

C_{tR} = C_t -Wert der Referenz (GAPDH3')

Die Basis, der in der Formel verwendeten Potenzen, gibt die PCR-Effizienz an, welche als optimal angenommen wurde und dabei einem Wert von 2 entspricht. Das heißt, man geht davon aus, dass sich während eines jeden PCR-Zyklus alle in der Probenlösung vorliegenden DNA-Kopien einmal verdoppeln. Die Konzentration der cDNA und damit die Höhe der Genexpression wurden relativ zur Expression des Housekeeping-Gens GAPDH berechnet.

Die Genexpression wurde relativ zur CD8-positiven Probe (unverdünnt) ermittelt. Für CD8-positiv liegt der C_t -Wert mit dem GAPDH3'-Primer bei 21,04 und der C_t -Wert, welcher mit dem CD8-Primerpaar erfasst wurde, liegt bei 22,77. Die relative Konzentration der CD8-positiven cDNA-Probe (relativ zum Housekeeping-Gen GAPDH3') wurde mithilfe der Formel 6 berechnet (siehe Berechnung 3):

Berechnung 3: relative Konzentration (cDNA CD8-positive Probe) = $2^{C_t(\text{CD8}) - C_t(\text{GAPDH3'})}$

Für die reine CD8-positive cDNA liegt der Wert für die relative Konzentration bei 0,301451957. Die relative Expression des CD8-Antigens in den klinischen Proben wurde ebenfalls auf Grundlage von Formel 6 berechnet. Als Referenz für die CD8-Genexpression diente die Expression des Housekeeping-Gens GAPDH3'. Dazu wurde der Quotient aus der relativen Konzentration der CD8-positiven cDNA (siehe Berechnung 3) und der klinischen Probe

bestimmt (siehe Berechnung 4). Die Expression wurde relativ zur Menge an GAPDH3'-Amplifikat ermittelt.

Berechnung 4:

$$\text{relative Expression CD8} = (2^{\text{Ct CD8 (CD8-positiv)}} - 2^{\text{Ct GAPDH3' (CD8-positiv)}}) / (2^{\text{Ct CD8 (Probe)}} - 2^{\text{Ct GAPDH3' (Probe)}})$$

Die relative Expression des CD8-Antigens in der CD8-positiven Probe wurde mit 1 (100%) berechnet und alle weiteren klinischen Proben und Kontrollen ins Verhältnis zu dieser Probe gesetzt (siehe Berechnung 4).

Um die errechneten Daten (relative Expression, relativ zur Probe CD8-positiv) besser miteinander vergleichen zu können, wurde die relative Expression prozentual angegeben und dafür mit dem Faktor 100 multipliziert.

Die auf Grundlage der angegebenen Formeln berechneten Daten sind im Anhang in Tabelle 61 dargestellt.

Die relative Genexpression wurde in Relation zur jeweiligen angefärbten Gewebeprobe (IHC-Daten) gesetzt und überprüft, ob die Genexpression mit den nach immunhistochemischer Färbung ausgezählten zytotoxischen T-Zellen korreliert. Die Daten aus der Genexpressionsanalyse wurden zum Gesamtanteil angefärbter Immunzellen im Gewebe ins Verhältnis gebracht. Um den Gesamtanteil gefärbter Immunzellen in den Gewebeproben zu ermitteln, wurde unter dem Mikroskop der Tumorgewebs-Anteil am gesamten Gewebe in Prozent bestimmt. Mithilfe des Tumorgewebs-Anteils wurde der in den einzelnen Gewebeproben vorliegende Anteil an gefärbten Immunzellen am gesamten Gewebe berechnet (siehe Formel 8).

$$(8) \text{ CD8-Anteil gesamt (\%)} = \frac{\text{Tumorzell-Anteil (\%)}}{100} * \text{CD8 im Tumor (\%)} + (1 - \frac{\text{Tumorzell-Anteil (\%)}}{100}) * \text{CD8 im Stroma (\%)}$$

Der Anteil an gefärbten Immunzellen im gesamten Gewebe (Tumor und Stroma) berechnet sich aus dem Tumor-Anteil im Gewebe multipliziert mit dem Anteil gefärbter Zellen im Tumor sowie dem Stroma-Anteil multipliziert mit dem Anteil gefärbter Zellen im Stroma. Diese beiden Werte (gefärbte Zellen im Tumor und im Stroma) werden miteinander addiert und bilden den Gesamtanteil gefärbter Immunzellen innerhalb der Gewebeprobe. Diese ermittelten Werte sind im Anhang in Tabelle 61 angegeben.

Um eine mögliche Korrelation zwischen den Daten aus der Immunhistochemie und der Genexpressionsanalyse zu begründen, wurde die Zahl CD8-positiver Zellen im gesamten Gewebe in Abhängigkeit von den Daten aus der qPCR (relative Genexpression CD8) dargestellt (siehe Abbildung 52).

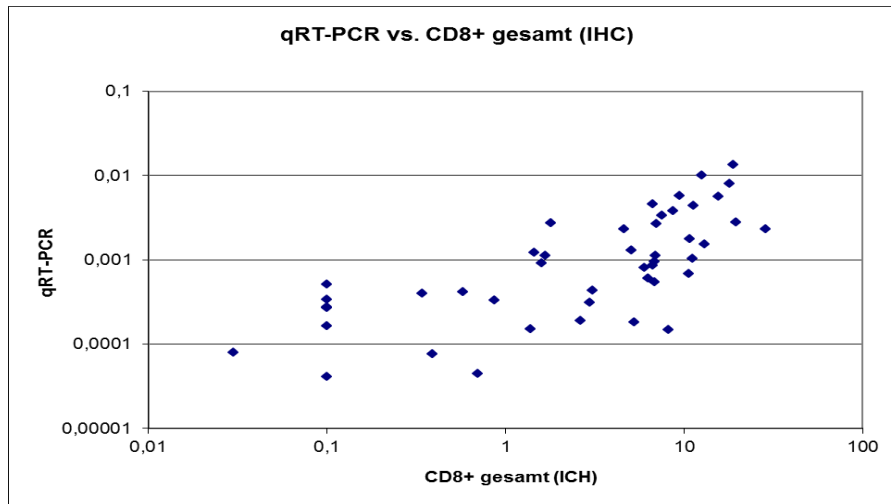


Abbildung 52 Überprüfung einer Korrelation zwischen IHC-Daten und Genexpressionsanalyse

Aus dem Diagramm ist zu erkennen, dass mit steigender Zahl an angefärbten Immunzellen im gesamten Gewebe, die relative Genexpression steigt. Daher ist es möglich, die Immunzellen in einem Gewebe mittels qPCR der isolierten und in cDNA umgeschriebenen RNA zu analysieren. Die Ergebnisse der beiden Methoden (Immunhistochemie und Genexpressionsanalyse) stimmen miteinander überein. Die Immunzellen können auf zellulärer Ebene wie auch auf RNA-Ebene in den Geweben detektiert werden.

Außerdem wurde die Zahl angefärbter Immunzellen im Tumor getrennt von den Daten der angefärbten Immunzellen im Stroma in Abhängigkeit von den Informationen aus der qPCR zur Genexpressionsanalyse dargestellt (siehe Anhang Abbildungen 80).

Die Auswertung des Anteils der angefärbten zytotoxischen T-Zellen im Tumor (in %) in Abhängigkeit von der relativen Genexpression ergab eine Korrelation zwischen den beiden Parametern. Das heißt, umso mehr Immunzellen im Tumorbereich der Gewebeproben ausgezählt wurden, desto höher war die Genexpression des CD8-Antigens. Außerdem wurde der Zusammenhang zwischen der Anzahl gefärbter Immunzellen im Stromabereich der Gewebe zur Höhe der Genexpression hergestellt, wie in Abbildung 81 dargestellt.

Auswertung mittels statistischer Tests

Mithilfe verschiedener statistischer Tests wurde die Korrelation zwischen den Parametern CD8-positive Zellen im Gewebe (IHC-Daten) und Genexpressions-Daten überprüft.

Dazu wurde die Korrelation mithilfe des **Pearson-Chi²-Tests** beurteilt (siehe Tabelle 57).

Tabelle 57 Korrelationsanalyse zwischen CD8-positiven Zellen im Gewebe und Genexpressionsanalyse: Pearson-Chi²-Test

| | | CD8ZellenGesamt | CD8expression |
|-----------------|--------------------------|-----------------|---------------|
| CD8ZellenGesamt | Korrelation nach Pearson | 1 | ,612** |
| | Signifikanz (2-seitig) | | ,000 |
| | N | 46 | 46 |
| CD8expression | Korrelation nach Pearson | ,612** | 1 |
| | Signifikanz (2-seitig) | ,000 | |
| | N | 46 | 46 |

**. Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

Der Pearson-Chi²-Test testet die in einer Stichprobe beobachtete Häufigkeitsverteilung über die Zellen einer Kreuztabelle auf Unabhängigkeit von Zeilen- und Spaltenvariablen. Die Nullhypothese sagt aus, dass die Zahl der CD8-positiven Zellen im Gewebe sich unabhängig von der CD8-Genexpression verhält, d. h. die Wertaussprägungen der beiden Variablen erscheinen unabhängig voneinander. Die Alternativhypothese definiert die beiden Variablen als miteinander assoziiert, d. h. bestimmte Wertaussprägungen der beiden Parameter treten überproportional häufig gemeinsam (gleichzeitig) auf. Mit dem Test wurde die Wahrscheinlichkeit berechnet, dass die gemeinsame Häufigkeitsverteilung der beiden Variablen Zahl der CD8-positiven im Gewebe und die CD8-Genexpression innerhalb des getesteten Patientenkollektivs aus einer Grundgesamtheit stammt, in der Unabhängigkeit zwischen den beiden Parametern besteht. Diese getestete Unabhängigkeit besteht, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit (α) von 5% überschritten wird. Die Alternativhypothese wird angenommen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 5\%$ unterschritten wird. Das Gegenstück zur Irrtumswahrscheinlichkeit stellt das Signifikanzniveau dar (95%). [URL-55]

Die Signifikanzgrenze wird bei $\alpha=0,05$ gesetzt und es ergab sich $p<0,01$. Es existiert einen signifikanten Zusammenhang zwischen IHC und RNA. Die Güte der Korrelation (Korrelationskoeffizient = 0,612) ist gut.

Um die nichtparametrische Korrelation auszutesten wurde **Spearman's Rho** (Rangkorrelationskoeffizient) bestimmt (siehe Tabelle 58).

Tabelle 58 Korrelationsanalyse zwischen CD8-positiven Zellen im Gewebe und Genexpressionsanalyse: Spearman's Rho

| | | | CD8ZellenGesamt | CD8expression |
|--------------|-----------------|-------------------------|-----------------|---------------|
| Spearman-Rho | CD8ZellenGesamt | Korrelationskoeffizient | 1,000 | ,748** |
| | | Sig. (2-seitig) | . | ,000 |
| | | N | 46 | 46 |
| | CD8expression | Korrelationskoeffizient | ,748** | 1,000 |
| | | Sig. (2-seitig) | ,000 | . |
| | | N | 46 | 46 |

** . Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig).

Der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman stellt ein Maß für die Stärke eines monotonen Zusammenhangs zwischen angefärbten CD8-positiven im Gewebe und dem CD8-Genexpressionsniveau dar. Damit wird getestet wie gut eine beliebige monotone Funktion den Zusammenhang zwischen CD8-positiven Zellen im Gewebe und die CD8-Genexpression beschreiben kann, ohne irgendwelche Annahmen über die Wahrscheinlichkeitsverteilung der Variablen zu machen. Im Gegensatz zum Korrelationskoeffizienten nach Pearson wurde die Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Spearman nicht auf einen linearen Zusammenhang gestützt. Voraussetzung für den Test sind unabhängige Beobachtungspaare, deren Zusammenhang untereinander monoton ist. [URL-56]

Auch hier wird die Signifikanzgrenze bei $\alpha=0,05$ gesetzt und es ergibt sich $p<0,01$. Also gibt es einen signifikanten Zusammenhang zwischen IHC und RNA. Die Nullhypothese ("kein Zusammenhang zwischen den untersuchten Parametern") muss abgelehnt werden und der Test ist signifikant.

Der **Mann-Whitney-U-Test** diene dazu eine zentrale Tendenz in zwei unabhängigen Gruppen zu unterscheiden. Es wurde die Verteilung der CD8-positiven Zellen im Tumor, im Stroma und im gesamten Gewebe sowie des Genexpressionsniveaus in den beiden Gruppen AAK-positiv und AAK-negativ überprüft (siehe Tabelle 59).

Tabelle 59 Mann-Whitney-Test

| | CD8ZellenGesamt | CD8ZellenTumor | CD8ZellenStroma | CD8expression |
|--------------------------------------|-----------------|----------------|-----------------|---------------|
| Mann-Whitney-U | 159,000 | 152,000 | 180,000 | 173,000 |
| Wilcoxon-W | 594,000 | 587,000 | 615,000 | 608,000 |
| Z | -1,994 | -2,236 | -1,524 | -1,673 |
| Asymptotische Signifikanz (2-seitig) | ,046 | ,025 | ,127 | ,094 |

Das Testverfahren stellt ein nicht-parametrisches statistisches Testverfahren dar und überprüft die zentrale Tendenz in den beiden unabhängigen Gruppen AAK-positiv und AAK-negativ. Der

AAK-Status stellt die Gruppierungsvariable (Gruppenvariable) dar. Die Frage, die man sich stellt ist: Gibt es Unterschiede hinsichtlich der zentralen Tendenz der Zahl CD8-positiver Zellen im Gewebe sowie der Expression des CD8-Antigens zwischen AAK-positiven und AAK-negativen Patientinnen?! [URL-57]

Die Gesamtzahl der CD8-positiven gefärbten Zellen weist einen Zusammenhang zum AAK-Status auf, da die Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% unterschritten wird ($\alpha = 0,046$). Die Zahl der CD8-positiven im Tumor korreliert statistisch mit dem AAK-Status ($\alpha = 0,025$). Innerhalb des Stromabereichs der Gewebe existiert zwischen den gefärbten zytotoxischen Zellen und dem AAK-Status kein statistischer Zusammenhang, da das Signifikanzniveau unterhalb von 95% liegt. Die Irrtumswahrscheinlichkeit liegt damit über der kritischen Grenze von 5% ($\alpha > 0,05$) bei 0,127. Zwischen der CD8-Genexpression und dem AAK-Status liegt kein statistischer Zusammenhang vor, da die kritische Grenze $\alpha > 0,05$ ($\alpha = 0,094$) und damit die Irrtumswahrscheinlichkeit größer als 5% ist.

Die Daten aus der Immunhistochemie konnten bezüglich der zytotoxischen T-Zellen mithilfe der Genexpressionsanalyse über die Methode der qPCR validiert und bestätigt werden.

Der Mann-Whitney-Test war für die RNA knapp nicht signifikant, aber man kann einen ähnlichen Trend wie zwischen Zellzahl und ICH-Daten erkennen. Der Grund für diesen Unterschied liegt darin, dass die ICH-Analyse Zellzahlen beurteilt, aber die RNA-Analyse nicht.

6 Diskussion

Das Auftreten intratumoraler Immunzell-Populationen wird in Ovarialkarzinom-Geweben analysiert und der Zusammenhang zum vorliegenden Autoantikörper-Status der Patientinnen untersucht. Die Detektion verschiedener Immunzell-Populationen in Ovarialkarzinom-Geweben wird mithilfe immunhistochemischer Färbungen unter Verwendung spezifischer Primärantikörper realisiert. Die Ergebnisse aus den Gewebe-Färbungen zur Detektion regulatorischer T-Zellen mit dem FoxP3-Primärantikörper hat man auf DNA-Ebene durch Methylierungsanalysen des Promotorbereichs des FoxP3-Gens validiert und überprüft. Diese Untersuchung wird über die Durchführung einer methylierungsspezifischen PCR in die Tat umgesetzt und findet Anwendung, um die Daten aus der IHC in einen Vergleich zu setzen. Da die Zahl der detektierten regulatorischen T-Zellen in den Geweben klein ist, wird diese Methode gewählt um zu prüfen, ob wenige Immunzellen über die Methylierung detektiert werden können.

Die Daten aus der Färbung zytotoxischer T-Zellen mit dem CD8-Primärantikörper werden auf RNA-Ebene über Genexpressionsanalysen reflektiert.

Die Überprüfung der IHC-Daten auf der Ebene der Genexpression wird angewendet, um die ermittelte statistische Signifikanz des Zusammenhangs zwischen CD8-positiven Zellen im Tumorbereich der Gewebe und dem AAK-Status auf der Ebene immunhistochemischer Färbungen auch auf RNA-Expressionsebene zu validieren.

6.1 Immunhistochemie

Die Methode der Immunhistochemie wird für die untersuchten Immunzellen (T-Helferzellen, zytotoxische T-Zellen, regulatorische T-Zellen und B-Zellen) etabliert. Das Gefriergewebe der Eierstocktumoren wird dazu mit dem Primärantikörper für CD4-Antigene angefärbt um T-Helferzellen zu detektieren, CD8-Primärantikörper werden zur Färbung der zytotoxischen T-Zellen genutzt, das nukleäre Protein FoxP3 wird zur Anfärbung regulatorischer T-Zellen verwendet und B-Zellen mit einem für CD20-Antigene spezifischen Primärantikörper gefärbt. Der Zusammenhang zwischen der Zahl gefärbter Immunzellen einer jeden Population im Stroma- bzw. Tumorbereich und dem AAK-Status wird durch die Anwendung statistischer Tests bestimmt.

Eine Feststellung von Makrophagen mit dem CD14-Primärantikörper ist unspezifisch, da vor allem im Tumorgewebe fast alle Zellen sowie in den Epithelzellen der Gewebe eine Anfärbung

zu beobachten ist. Die Anfärbung der Immunzell-Population der Makrophagen wird mit dem Primärantikörper CD163 etabliert.

Zwischen den CD8-positiven Zellen im Tumorbereich der Gefrierewebe und dem AAK-Status hat man eine statistisch signifikante Korrelation anhand statistischer Tests bewiesen. Bei den weiteren untersuchten Immunzell-Populationen (T-Helferzellen, regulatorische T-Zellen, Makrophagen, B-Zellen) ist weder im Tumor- noch im Stromabereich eine statistische Signifikanz zum AAK-Status gefunden worden. Zwischen angefärbten Immunzellen und AAK-Status wird kein statistischer Zusammenhang ermittelt.

Während der Auswertung der angefärbten OvCa-Gewebeproben ist das Auftreten von angefärbten Immunzell-Infiltraten beobachtet worden. Bei diesen Infiltraten handelt es sich um Ansammlungen von Immunzellen innerhalb des Stromagewebes. Deren Auftreten wird für jedes Gewebe notiert. Bei der Auswertung eines möglichen Zusammenhangs zwischen dem Auftreten der Infiltrate und dem vorliegenden AAK-Status fällt auf, dass bei den meisten AAK-positiven Gewebeproben Immunzell-Infiltrate im Gewebe auftreten. Lediglich eine Probe bildet eine Ausnahme – trotz des positiven AAK-Status sind keine Immunzell-Infiltrate im Gewebe zu finden. Man könnte aus dieser Beobachtung schließen, dass vermehrt Immunzellen in Form von Infiltraten eine humorale Immunantwort gegen p53 begünstigt. Die Häufigkeit des Auftretens der Immunzell-Infiltrate verhält sich bei AAK-negativen Patientinnen niedriger als bei AAK-positiven Patientinnen.

6.2 Methylierungsanalyse des FoxP3-Promotorbereichs

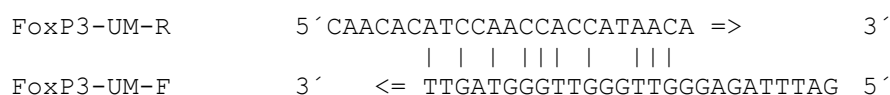
Die Methylierung ist in den klinischen Proben ausschließlich semiquantitativ detektierbar. Die Auswertung des Anteils an nicht-methylierten Cytosinen innerhalb der CpG-Inseln des untersuchten FoxP3-Genabschnitts ist ausschließlich anhand des Gelbildes nach einer Auftrennung in einem 2%-igen Agarosegel möglich. Bei der semiquantitativen Auswertung der nicht-methylierungsspezifischen qPCR wird der Methylierungsgrad anhand der Stärke der Banden in vier Gruppen eingeteilt – negativ, schwach, mittel und stark. Eine Auswertung der C_t -Werte aus der qPCR ist ausgeschlossen, da die Menge an unspezifisch gebildeten Primer-Dimeren so groß ist, dass diese gestört wird. Eine Quantifizierung des Methylierungsgrades anhand der nicht-methylierungsspezifischen qPCR ist durch das Vorkommen der Primer-Dimere in den Proben nicht zu realisieren, weil die PCR nicht effizient genug läuft. Die PCR-Effizienz wird durch das Fehlen der Primer-Oligonukleotide und der Desoxyribonukleotide, welche durch die Amplifikation der Primer minimiert werden, herabgesetzt. Die Primer-Dimere

können durch Austesten verschiedener Primer-Konzentrationen, unterschiedlicher PCR-Mixe und verschiedener Annealing-Temperaturen nicht vermindert oder vollständig beseitigt werden ohne dabei die Menge des spezifisch gebildeten Produktes zu beeinflussen.

Die Analyse des methylierten Anteils in dem FoxP3-Promotorabschnitt kann anhand der C_t -Werte aus der qPCR vorgenommen werden. Als Referenzkontrolle dient nicht das mittels mikrobiologischer Methoden generierte rekombinante Kontroll-Plasmid, welches das GOI als Insert trägt, sondern DNA aus einer Abstrich-Probe. Die in-vitro-Methylierung des Kontroll-Plasmids war nur teilweise erfolgreich und zum großen Teil liegt das Plasmid nach der Methylierung weiterhin unmethyliert vor. Warum dieser Arbeitsschritt erfolglos war, ist unklar, aber es besteht die Möglichkeit, dass die gewählte SssI Methyltransferase der Firma New England Biolabs nicht in der Lage ist zirkulär vorliegende Plasmid-DNA zu methylieren.

Die als Referenz in der qPCR eingesetzte Abstrich-Probe liegt bezüglich des zu untersuchenden Gens methyliert vor, da in Abstrichen keine regulatorischen T-Zellen vorkommen. Mithilfe einer zusätzlichen in-vitro Methylierung der Abstrich-DNA wird die DNA-Methylierung sichergestellt.

Die Methode der Methylierungsanalyse verfügt über einen limitierenden Faktor, nach dem eine quantitative Einordnung des Methylierungsgrades nicht möglich ist. Dieser limitierende Faktor sind die während der qPCR entstandenen Primer-Dimere. Die theoretische Möglichkeit für eine Dimerbildung bei den FoxP3-UM Primern ist der Annealing-Prozess zwischen den verwendeten Oligonukleotid-Primern. Forward- und Reverse-Primer hybridisieren miteinander:



An dem dabei entstandenen doppelsträngigen DNA-Abschnitt kann die DNA-Polymerase ansetzen und das überhängende einzelsträngige Ende mit Nukleotiden in einen Doppelstrang vervollständigen.

Die Ergebnisse der Methylierungsanalyse werden nach dem vorliegenden Autoantikörper-Status in AAK-positiv und AAK-negativ differenziert und mittels statistischer Verfahren getestet, ob ein Unterschied im Methylierungsstatus zwischen den beiden Gruppen bezüglich des Autoantikörper-Status vorliegt. Weder für die Werte der relativen Methylierung, welche anhand der methylierungsspezifischen Analyse generiert wird, noch für den Grad der Nicht-

Methylierung, die über die Bandenstärke im Agarosegel bestimmt wird, kann ein signifikanter Zusammenhang zwischen Methylierung und AAK-Status gefunden werden. Die Höhe der Methylierung sagt nichts über den vorliegenden AAK-Status aus. Die Analyse der Methylierung innerhalb des FoxP3-Genabschnitts in den klinischen Proben bestätigt die Daten aus der Immunhistochemie: Die Anzahl FoxP3-positiver Zellen im Gewebe steht in keinem statistisch signifikanten Zusammenhang zum AAK-Status.

Um die Daten aus der methylierungsspezifischen qPCR direkt auswerten zu können und in einen Vergleich mit der immunhistochemischen Färbung zu bringen, müssen die klinischen Proben erneut in eine verbesserte methylierungsspezifische PCR eingesetzt werden. Mithilfe der Primerpaare für β -Aktin und methylierte CpG-Inseln im FoxP3-Genabschnitt, müssen erneut C_t -Werte generiert werden um daraus die relative Methylierung zu berechnen. Die Daten aus dem ersten Ansatz (Ergebnisse aus dieser Arbeit) und dem zweiten Ansatz (Ausblick) müssen in Relation zueinander gesetzt werden, um die methylierungsspezifische PCR zu verbessern. Ein neuer Assay für die Anwendung einer Methylierungsanalyse muss statt auf dem Sybr-Green-System auf der Grundlage von TaqMan-Sonden basieren. Diese Sonden stellen kurze DNA-Stücke dar, welche mit der Template-DNA hybridisieren und an dem einen Ende einen Reporterfarbstoffe sowie an dem anderen Ende einen Quencher tragen. Quencher charakterisieren Moleküle, die in der Lage sind Fluoreszenzen von Farbstoffen in ihrer Nähe abzufangen. Innerhalb der PCR bauen die Polymerase-Enzyme, während der Verdopplungsreaktionen der DNA-Vorlage, die TaqMan-Sonden ab. Der Reporterfarbstoff wird freigesetzt und gelangt aus dem Einflussbereich des Quenchers. Das heißt die Fluoreszenz des Farbstoffs ist nur unter der Bedingung messbar, dass die Polymerase das gewünschte DNA-Target amplifiziert hat. Jedes freigesetzte Reporterfarbstoff-Molekül entspricht einem gebildeten DNA-Strang. Die Sonde kann zusätzlich zu den Primern zur Spezifität für methylierte bzw. nichtmethylierte DNA beitragen. Daher kann man die Primer etwas anders positionieren - weniger spezifisch für den Methylierungszustand. Durch die zusätzliche Spezifität aufgrund der Sonde wird die Spezifität wiederum verbessert. Daher ist es möglich das Primer-Design zu verändern und den Primer so zu gestalten, dass keine Dimere mehr gebildet werden. Die Entstehung von Primer-Dimeren war das Hauptproblem der nicht-methylierungsspezifischen PCR.

6.3 Genexpressionsanalyse des Genabschnitts des CD8-Gens

Die statistisch signifikante Korrelation zwischen der Zahl CD8-positiver Zellen und dem AAK-Status wird mithilfe von Genexpressionsanalysen für das CD8-Beta-Gen auf RNA-Ebene bestätigt. Die innerhalb der Methode verwendeten Primer verhalten sich in der cDNA-Probenlösung, die aus CD8-positiven T-Lymphozyten und aus der SKOV3-Ovarialkarzinom-Zelllinie gewonnen wird, spezifisch.

Die Zahl der mit dem CD8-Primärantikörper angefärbten Zellen im gesamten Gewebe zeigt sowohl zur Genexpression als auch zum AAK-Status einen signifikanten Zusammenhang. Diese gilt ebenfalls für die spezifische Begutachtung der Tumorareale. Die angefärbten Zellen im geweblichen Stromabereich zeigen keinen statistischen Zusammenhang zu Genexpression oder dem vorliegenden AAK-Status. Auch die CD8-Genexpression zeigt knapp keinen signifikanten Zusammenhang mit dem Auftreten der AAK. Ein Grund für diese Diskrepanz - signifikanter Zusammenhang zwischen Immunhistochemie-Daten und dem Autoantikörper-Status, signifikanter Zusammenhang zwischen Immunhistochemie und Autoantikörper-Status, aber kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen CD8-Genexpression und Autoantikörper-Status - , könnte vorliegen, da die Zellzahl der CD8-positiven Zellen unabhängig von der Stärke der Proteinexpression bewertet worden sind.

In der Genexpressionsanalyse kann man die Zahl der Zellen nicht bestimmen, die das Gen exprimieren. Die Menge an CD8-RNA korreliert sicher mit der Zellzahl aus der Immunhistochemie, aber durch Schwankungen im Zell-spezifischen Expressionslevel wird der Effekt abgeschwächt.

Bei der Einschätzung der Genexpression in den klinischen Proben muss beachtet werden, dass die Immunzell-Verteilung innerhalb der Tumorböcke, von denen die Gewebeschnitte für die Analyse gewonnen werden, nicht identisch ist. Durch Schneiden der Gewebeköcke mit dem Gefrier-Mikrotom verändert sich in tiefer-liegenden Zellschichten die Verteilung der enthaltenen Immunzell-Populationen. Man muss davon ausgehen, dass die angefärbten Gewebe nicht mit den Geweben identisch sind, aus denen die RNA-isoliert wird.

7 Ausblick

Die Daten aus der Immunhistochemie müssen an einem weiteren Probenet überprüft und bestätigt werden. Mithilfe von Methylierungs- und Genexpressionsanalysen werden die neuen IHC-Daten validiert. Weiterhin sollten die bereits mittels immunhistochemischem Verfahren gefärbten Ovarialkarzinom-Gewebe von weiteren unabhängigen Personen ausgewertet werden. Die Methylierungs- und Genexpressionsanalysen müssen danach an dem bereits vorliegenden Probenet erneut durchgeführt werden, um einen gewissen Grad an Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

Über die Heterogenität der Immunzell-Verteilung innerhalb der Tumorentitäten liegen bisher noch keine Daten vor. Es muss geklärt werden, ob der Anteil bestimmter Immunzellen in einem 3 cm bis 5 cm entfernten Abschnitt derselbe ist.

Der Zusammenhang zwischen der Zahl CD8-positiver Zellen im Tumorbereich der Gewebe und dem vorliegenden AAK-Status ist möglicherweise nur eine statistische Korrelation. In zukünftigen Arbeiten muss ein biologischer Zusammenhang zwischen den beiden Parametern untersucht werden. P53 ist nicht das einzige Protein, auf das OvCa-Patientinnen Autoantikörper bilden. Im Kontext des Ovarialkarzinoms werden auf das epitheliale Protein EpCam ebenfalls Autoantikörper gebildet. Es ist möglich, dass Patientinnen, die keine AAK gegenüber p53 bilden, AAK gegen andere Proteine bilden. Das Vorkommen von weiteren AAK neben den p53-AAK muss in Ovarialkarzinom-Patientinnen untersucht werden. Das heißt, es muss geklärt werden, ob die Beziehung des Auftretens bestimmter Immunzellen im Kontext des Auftretens von Autoantikörpern ein generelles Phänomen darstellt, oder speziell nur bei den p53-AAK zu beobachten ist. Diese Untersuchungen liefern erste Einblicke in funktionelle Zusammenhänge zwischen Immunzellen und Autoantikörpern.

Die methodische Umsetzung der Untersuchung eines funktionellen Zusammenhangs wird dadurch realisiert, dass sofort nach der Operation der Patientinnen entnommenes Gewebe mittels Zellkulturtechnik in Kultur gebracht wird, um enthaltene vitale T-Lymphozyten auszuwachsen zu lassen. Die Funktion der CD8-positiven Zellen wird im lebenden Gewebe überprüft, indem die Spezifität eines spezifischen Antigens überprüft wird. Die TILs (tumour infiltrating lymphocytes) werden aus dem Gewebe isoliert, kultiviert und charakterisiert.

Außerdem ist es möglich, die exprimierten Proteine in den einzelnen Geweben mittels Western-Blot zu untersuchen. Dabei werden die Proteine aus den Proben geblottet. Da aber für die Sichtbarmachung der Proteine auf der Membran keine Antikörper zur Verfügung

stehen, werden IgG-Antikörper aus dem Serum der jeweiligen Patientin isoliert und gelabelt. Da menschliche Antikörper nicht in der Lage sind menschliche Proteine zu erkennen, erscheint bei einer Anwendung der humanen Immunglobuline auf dem Blotting-Papier alles negativ. Eine Ausnahme bilden Autoantikörper, die in der Lage sind auch humane Proteine zu erkennen und Signale im Western Blot zu erzeugen. Durch die Verwendung von Gesamt-IgG aus Serumproben sollte eine unvoreingenommene Analyse von Autoimmunreaktionen, auch gegen noch unbekannte Tumorantigene, möglich sein. Somit sollte geklärt werden können ob p53-AAK negative Patientinnen mit wenig CD8 Zellen im Tumor generell keine Immunantwort zeigen, oder ob das ein p53-spezifischer Zusammenhang ist.

Eine Ausnahme bilden Autoantikörper gegen mutiertes p53, da ausschließlich p53-AAK die mutierten p53-Proteine erkennen.

Diese Erkennung erfolgt auf der Grundlage von NY-ESO-1 Antigenen durch spezifische Antikörper. Die medizinische Anwendung von Autoantikörpern könnten Assays auf Array-Basis sein, mit deren Hilfe eine Autoimmunreaktion und der Hinweis auf ein Ovarialkarzinom bereits in einem frühen Stadium der Erkrankung detektiert werden.

8 Zusammenfassung

Das Ovarialkarzinom ist eine sehr heimtückische Erkrankung, da sie frühzeitig im Bauchraum streuen kann und oftmals lange ohne klare Symptome verläuft. Daher werden Tumoren am Ovar (Eierstock) erst sehr spät erkannt, wenn sich die Patientin in einem fortgeschrittenen Tumorstadium befindet (FIGO III, IV), in dem eine peritoneale Karzinomatose vorliegt. [Chene et al., 2014]

Es existieren bisher keine zuverlässigen Screening-Maßnahmen (CA125, Vaginalsonographie), die angewendet werden können um den Krebs in frühen Stadien zu diagnostizieren (FIGO I, II). Deshalb hat es sich die Forschung zum Ziel gemacht, neue charakteristische Tumormarker zu entwickeln, die den Tumor bereits in einem frühen Stadium manifestieren können. [URL-58]

Das Wächtergen *TP53*, welches für das Tumorsuppressor-Protein p53 kodiert, ist das im Zusammenhang mit Ovarialkarzinomen am häufigsten erwähnte Tumorsuppressorgen. Etwa 50-70% der Patientinnen mit Ovarialkarzinom weisen eine p53-Mutation auf. [URL-59]

Das Protein p53 reguliert Zellwachstum und Apoptose sowie die Entstehung von Tumoren. Ist es mutiert, kommt es häufig zur Entstehung von Tumoren. Das Immunsystem bildet gegen das mutierte Protein p53 Autoantikörper, die als mögliche neue Tumormarker gelten. Nicht alle Patientinnen mit Ovarialkarzinom bilden diese p53-Autoantikörper. [Marks et al., 1990] 20%-40% der Ovarialkarzinom-Patientinnen bilden Autoantikörper gegen das vom mutierten *TP53*-Gen produzierte p53.

Um herauszufinden warum manche Patientinnen Autoantikörper gegen das mutierte Protein p53 bilden und andere nicht, wurde in dieser Arbeit ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von bestimmten Immunzellen und dem Auftreten bzw. Nicht-Auftreten von Autoantikörpern (Autoantikörper-positiv bzw. -negativ) untersucht.

Dazu wurden die Immunzellpopulationen der T-Helferzellen, zytotoxischen T-Zellen, regulatorischen T-Zellen, Makrophagen und B-Zellen in Gewebe-Schnitten resektierter Tumoren von Ovarialkarzinom-Patientinnen detektiert und quantifiziert. Mittels der Methode der Immunhistochemie wurden die verschiedenen Immunzellen angefärbt (Detektion) und über die Auswertung unter dem Mikroskop die prozentuale oder absolute Häufigkeit der angefärbten Immunzellen in den intratumoralen und extratumoralen Bereichen der Gewebe-Proben bestimmt (Quantifizierung).

Ein möglicher Zusammenhang zwischen der Anzahl an Immunzellen inner- bzw. außerhalb des Tumors in einem Gewebe und dem Autoantikörper-Status (positiv oder negativ) wurde durch

die Anwendung statistischer Tests (χ^2 -Test, Fischer's Exact Test) ermittelt. Ausschließlich zwischen zytotoxischen T-Zellen innerhalb des Tumorgewebes und dem Autoantikörper-Status konnte ein signifikant statistischer Zusammenhang festgestellt werden. Dieses Ergebnis wurde mithilfe von Genexpressionsanalysen am Genabschnitt des CD8-Gen auf RNA-Ebene validiert und bestätigt. Die Genexpression und die Anzahl der CD8-positiven Zellen korreliert miteinander, aber das Genexpressionsniveau unterscheidet sich in den Autoantikörper-positiven und negativen Ovarialkarzinom-Patientinnen knapp nicht signifikant. Der mittels Genexpression nicht bestätigte Zusammenhang zwischen Autoantikörper-Status und CD8-Expression, ist darauf zurückzuführen, dass die Expression des CD8-Gens in den CD8-positiven Zellen schwankt. Nur bei der immunhistochemischen Analyse ist eine direkte Quantifizierung der Anzahl an CD8+ Zellen möglich.

Die in den Geweben in geringer Zahl angefärbten FoxP3-positiven Zellen (regulatorische T-Zellen) wurden auf DNA-Ebene über die Strategie der Methylierungsanalyse des FoxP3-Genabschnitts validiert und bewiesen. Die geringe Anzahl FoxP3-positiver Zellen in den Geweben (Immunhistochemie-Daten) begründen hohe Methylierungsstatus in den Proben. Eine Quantifizierung der nicht-methylierten FoxP3-DNA war, durch das Auftreten von Primer-Dimeren in der quantitativen Real-time-PCR, nicht möglich. Die Daten wurden ausschließlich semiquantitativ, anhand der gelelektrophoretischen DNA-Auftrennung der amplifizierten Proben, analysiert.

Da zwischen der Zahl CD8-positiver Zellen im Tumoreal der Gewebe und dem AAK-Status ausschließlich eine statistische Korrelation gefunden wurde, muss in künftigen Arbeiten ein biologischer Zusammenhang zwischen der Immunzell-Population der zytotoxischen T-Zellen und dem AAK-Status nachgewiesen werden um die Ergebnisse dieser Arbeit zu stützen.

Literaturverzeichnis

Internetseiten:

URL-1 (08.10.2014)<http://www.jameda.de/krankheiten-lexikon/eierstockkrebs/>; Eierstockkrebs - Symptome, Beschwerden, Ursachen - Krankheiten-Lexikon

URL-2 (14.10.2014) Der Blaue Ratgeber – Krebs der Gebärmutter und Eierstöcke. Antworten-Hilfen-Perspektiven; Deutsche Krebshilfe e. V.; Ausgabe 3/2011 Seite: 8; ISSN 0946-4816, Art.-Nr. 003 0031;

URL:

http://www.krebshilfe.de/fileadmin/Inhalte/Downloads/PDFs/Blaue_Ratgeber/003_gebaermutter_eierstock.pdf

URL-3 (06.10.2014) DocCheck Medical Services GmbH; URL: <http://flexikon.doccheck.com/de/Ovar>; Dr. Frank Antwerpes, Rafael Eiter, Patrick Messner; *Ovar*

URL-4 (15.05.2014)http://www.gesundheitsberater-berlin.de/system/images/96/original/Grafik_Uterus_SPL.jpg

URL-5 (15.05.2014)<http://www.dr-gumpert.de/html/eierstockkrebs.html>; Gumpert Nicolas

URL-6 (06.09.2014)<http://www.jameda.de/gesundheits-lexikon/bilder/big/506704.jpg>

URL-7 (05.09.2014)<http://www.duden.de/rechtschreibung/proximal>

URL- 8 (29.05.2014) [http://globocan.iarc.fr/old/age-](http://globocan.iarc.fr/old/age-specific_table_r.asp?selection=75276&title=Germany&sex=2&type=1&stat=0&window=1&sort=0&submit=%C2%A0Execute%C2%A0)

[specific_table_r.asp?selection=75276&title=Germany&sex=2&type=1&stat=0&window=1&sort=0&submit=%C2%A0Execute%C2%A0](http://globocan.iarc.fr/old/age-specific_table_r.asp?selection=75276&title=Germany&sex=2&type=1&stat=0&window=1&sort=0&submit=%C2%A0Execute%C2%A0); GLOBOCAN 2012 age-specific table; ovarian cancer

URL-9 (23.04.2014) Robert-Koch-Institut. Krebs in Deutschland 2009/2010

URL:

http://www.rki.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2013/krebs_in_deutschland_2013.pdf?__blob=publicationFile

URL-10 (22.04.2014) Effektives_Screening_auf_Ovarialkarzinome;

http://www.dkk2014.de/files/dkk2014/content/Presse/Effectives_Screening_auf_Ovarialkarzinome%20.pdf

URL-11 (22.04.2014) Effektives_Screening_auf_Ovarialkarzinome;

http://www.dkk2014.de/files/dkk2014/content/Presse/Effectives_Screening_auf_Ovarialkarzinome%20.pdf

URL-12 (23.04.2014) http://biostat.userweb.mwn.de/teaching/bm2005/slides2_4.pdf; slides2_4; Biostatistische Methoden – Epidemiologische Maßzahlen

URL-13 (22.04.2014) [http://www.diss.fu-](http://www.diss.fu-berlin.de/diss/servlets/MCRFileNodeServlet/FUDISS_derivate_000000002999/1_Kapitel1.pdf)

[berlin.de/diss/servlets/MCRFileNodeServlet/FUDISS_derivate_000000002999/1_Kapitel1.pdf](http://www.diss.fu-berlin.de/diss/servlets/MCRFileNodeServlet/FUDISS_derivate_000000002999/1_Kapitel1.pdf);jsessionid=55AA043103DF0865264E975B8BEE95E3?hosts=

URL-14 (23.04.2014) http://www.krebsregister.saarland.de/konzept/konzept8_inhalt.html; Krebsregister: Konzept;

URL-15 (23.04.2014) <http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/epi/sp95/sp95-chap11.pdf>; Chapter

11. Statistical methods for registries, P. Boyle and D.M. Parkin, International Agency for Research on Cancer, 150 cours Albert Thomas, 69372 Lyon Cidex 08, France

URL-16 (23.04.2014) [http://campus.uni-](http://campus.uni-muenster.de/fileadmin/einrichtung/epi/download/vorlesungen/Skript_Epi_MedSoz_MedInf.pdf)

[muenster.de/fileadmin/einrichtung/epi/download/vorlesungen/Skript_Epi_MedSoz_MedInf.pdf](http://campus.uni-muenster.de/fileadmin/einrichtung/epi/download/vorlesungen/Skript_Epi_MedSoz_MedInf.pdf); Häufigkeitsmaße in der Epidemiologie

URL-17 (22.04.2014)

http://www.mlhb.de/fileadmin/user_upload/Fachinfo/Laborinfo/He4_und_CA125_Kombinierte_Tumormarker_des_Ovarialkarzinoms_im_ROMA-Index_02012w.pdf; HE4 und CA 125: Kombinierte Tumormarker des

Ovarialkarzinoms im ROMA-Index, Medizinische Labor Bremen, Ärzte für Laboratoriumsmedizin, Mikrobiologie und Infektionsepidemiologie, Biochemie; Umweltmedizin

- URL-18 (22.04.2014) http://www.uniklinikum-dresden.de/das-klinikum/kliniken-polikliniken-institute/gyn/dokumente/lehre/canzler/Ovarialkarzinom_und_Mammakarzinom.pdf; Ovarialkarzinom, Mammakarzinom – Ulrich Canzler
- URL-19 (25.05.2014) <http://www.frauenheilkunde-aktuell.ch/frauenheilkunde-d/PDF-Ordner-FHA-Frauenheilkunde-aktuell/Frauenheilkunde-Aktuell-Ausgabe-11-04/FHA-Artikel-im-dialog.pdf>
- URL-20 (25.05.2014) DocCheck Medical Services GmbH; URL: <http://flexikon.doccheck.com/de/Autoantik%C3%B6rper>, *Autoantikörper*; Autoren: Dr. Frank Antwerpes, Dr. med Norbert Ostendorf, Dr. med Mark-Christopher Spoerl
- URL-21 (25.05.2014) http://www.medizin.uni-tuebingen.de/uktmmedia/EINRICHTUNGEN/Kliniken/Medizinische+Klinik/Innere+Medizin+II/PDF_Archiv/Klein_autoantikoeper.pdf; Klinische und diagnostische Relevanz von Autoantikörpern, Reinhild Klein, Medizinische Klinik Tübingen, Abt. II
- URL-22 (25.05.2014) http://www.labor-ostsachsen.de/php/analysen/analyse_id.php?such_id=4404; Medizinisches Labor Ostsachsen Datensatzanzeige
- URL-23 (10.10.2014) <http://www.promega.com/~media/files/resources/protocols/technical%20manuals/0/pgem-t%20and%20pgem-t%20easy%20vector%20systems%20protocol.pdf>; pGEM(R)-T and pGEM(R)-T Easy Vector Systems Technical Manual TM042, Promega Corporation, 2800 Woods Hollow Road, USA
- URL-24 (01.05.2014) <http://www.ekonsil.de/articles/28701-h-matoxylin>; Hämatoxylin - ekonsil.de; Godwin Avwioro (2011): *Histochemical Uses Of Haematoxylin - A Review*. In: *International Journal of Research and Reviews in Applied Sciences*. Bd. 1, S. 24-34
- URL-25 (01.05.2014) <http://cgi-host.uni-marburg.de/~omspezbo/nutzpflanzen/details.cgi?id=384>; Nutzpflanzendatenbank, Stephan Imhof
- URL-26 (11.05.2014) http://archiv.ub.uni-marburg.de/diss/z1998/0089/html/1_9.htm; Universität Marburg, Histologische Färbungen
- URL-27 (11.05.2014) http://www.univie.ac.at/mikroskopie/1_grundlagen/faerbung/methoden/1_methoden.htm; Universität Wien, Volgger, Mag Michael, Färbemethoden
- URL-28 (12.05.2014) <http://www.laborwissen.de/wiki/tiki-index.php?page=HE-F%C3%A4rbung>; Odobasic, Sanel; HE-Färbung
- URL-29 (15.09.2014) <http://www.thermoscientificbio.com/general-reagents-and-accessories/x-gal/>; Thermo Scientific – X-Gal
- URL-30 (15.09.2014) <http://www.thermoscientificbio.com/general-reagents-and-accessories/iptg/>; Thermo Scientific - IPTG
- URL-31 (12.08.2014) http://www.nfstc.org/pdi/Subject00/pdi_s00.htm; Science Serving Justice, DNA Analyst Training – Course Introduction
- URL-32 (13.08.2014) http://www.google.de/url?url=http://opus.bibliothek.uni-wuerzburg.de/files/122/3material.pdf&rct=j&frm=1&q=&esrc=s&sa=U&ei=F0zrU6THB6ml4gTdjYD4Aw&ved=0CC0QFjAE&usg=AFQjCNHE2i_CHnnXTHyygTvzjOf5m4lr4g; Uzinf042, Methoden.PDF
- URL-33 (14.08.2014) [http://www.google.de/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CCAQFjAA&url=http%3A%2F%2Fdas-labor.npage.de%2Fget_file.php%3Fid%3D18832775%26vnr%3D148121&ei=yh_vU5OCHOT-4Qsq_IF4&usg=AFQjCNFFBGXBeminkynkUBQfv2TOxi5MCA; www.wege-der-wissenschaft.de; Das Labor Deutschland \(2011\) Das Labor - Molekularbiologisches Praktikum; Phenol, Phenol/ Chloroform, Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol Extraktion](http://www.google.de/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CCAQFjAA&url=http%3A%2F%2Fdas-labor.npage.de%2Fget_file.php%3Fid%3D18832775%26vnr%3D148121&ei=yh_vU5OCHOT-4Qsq_IF4&usg=AFQjCNFFBGXBeminkynkUBQfv2TOxi5MCA; www.wege-der-wissenschaft.de; Das Labor Deutschland (2011) Das Labor - Molekularbiologisches Praktikum; Phenol, Phenol/ Chloroform, Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol Extraktion)
- URL-34 (23.07.2014) DocCheck Medical Services GmbH; Dipl.-Biol. Timo Freyer, Bettina Beutler, Sebastian Merz; *Gelelektrophorese*; URL: <http://flexikon.doccheck.com/de/Gelelektrophorese>
- URL-35 (23.07.2014) <http://www.biochemie.uni-jena.de/files/Praktikum/plasmid%20dna%20+%20restrictionsverdau.pdf> Versuch 11: Isolierung von Plasmid DNA, Restriktionsverdau und DNA-Elektrophorese – Biochemie; Universität Jena
- URL-36 (12.06.2014) http://www.roche.com/pcr_d.pdf; PCR: Eine ausgezeichnete Methode, Roche Diagnostics GmbH

- URL-37 (13.09.2014) DocCheck Medical Services GmbH; Dipl.-Biologe Timo Freyer, Mert Berk; *Restriktionsenzym*;
URL: <http://flexikon.doccheck.com/de/Restriktionsenzym>
- URL-38 (15.09.2014) Werkzeuge der Gentechnik – Chemgapedia;
<http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/5/bc/gentechnik/tools.vlu/Page/vsc/de/ch/5/bc/gentechnik/tools/restriktionsenzyme/restriktionsenzyme.vscml.html>
- URL-39 (10.10.2014) DocCheck Medical Services GmbH; Dr. Frank Antwerpes, Annika Thüns, Franziska Kupka; *DNA-Ligase*; URL: <http://flexikon.doccheck.com/de/DNA-Ligase>
- URL-40 (10.10.2014) New England Biolabs Inc.; Restriktionsenzyme; URL: <https://www.neb.com/>
- URL-41 (15.09.2014) DocCheck Medical Services GmbH; Linnea Mathies, Dr. Frank Antwerpes, Emrah Hircin; *DNA-Sequenzierung*; URL: <http://flexikon.doccheck.com/de/DNA-Sequenzierung>
- URL-42 (2010) <http://www.oncgnostics.com/images/stories/ONCGNOSTICS/laborwelthomepage.pdf>
laborwelthomepage. Laborwelt Nr. 6/2010 – 11. Jahrgang – Polymerasekettenreaktion; Dr. Alfred Hansel und Prof. Dr. Matthias Dürst, Gynäkologische Molekularbiologie, Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Universitätsklinikum Jena
- URL-43 (19.08.2014) <http://www.methylogix.com/genetics/protocols.shtml-Dateien/schumachersguide1.pdf>;
Schumacher's guide for: Bisulfite conversion of DNA for methylation fine-mapping. Dr. Axel Schumacher; Version 1.b; Last modified 10th of February 2009
- URL-44 (12.06.2014) <http://sundoc.bibliothek.uni-halle.de/diss-online/06/06H085/t3.pdf>;
Master Final.; 20060620160344 Master FinalMatthias
- URL-45 (11.10.2014) <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/m6250?lang=de®ion=DE>; 2-Mercaptoethanol ≥99.0% | Sigma-Aldrich
- URL-46 (01.10.2014) Immunologische Verfahren - Chemgapedia
http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/8/bc/vlu/proteinanalytik/immunologische_verfahren.vlu/Page/vsc/de/ch/8/bc/proteinanalytik/methoden_protein/meth11.vscml.html
- URL-47 (11.10.2014) Durchflusszytometrie (FACS): Messprinzip & Aufbau (Ressourcen);
URL: <http://www.antikoerper-online.de/resources/17/1247/Durchflusszytometrie+FACS+Messprinzip++Aufbau/>
- URL-48 (25.09.2014) Suny Downstate Medical Center – The Lymphatic System;
<http://ect.downstate.edu/courseware/histomanual/lymphatic.html>
- URL-49 (17.09.2014) DocCheck Medical Services GmbH; Stud.med.dent. Sascha Alexander Bröse, Dr. Frank Antwerpes; *Tonsille* <http://flexikon.doccheck.com/de/Tonsille>
- URL-50 (03.09.2014) Lab Faqs-Roche-Diagnostic bench mate;
<http://lifeserv.bgu.ac.il/wb/zarivach/media/Documentation/Lab%20Faqs-Roche-Diagnostic%20bench%20mate.pdf>
- URL-51 (12.09.2014) New England Biolabs – Tools and Resources – Nucleic Acid Data; <https://www.neb.com/tools-and-resources/usage-guidelines/nucleic-acid-data>
- URL-52 (30.08.2014) Umrechner für Maßeinheiten /Einheiten umrechnen/Masseinheit-Rechner; Hainke, Thomas; Univ, Dipl Informatiker ; <http://www.einheiten-umrechnen.de/>
- URL-53 (13.09.2014) DocCheck Medical Services GmbH; Nina Offierowski, Dr. Frank Antwerpes, Julian Becker; *Aktin*;
<http://flexikon.doccheck.com/de/Aktin>
- URL-54 (26.09.2014) DocCheck Medical Services GmbH; Sebastian Merz; *Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase*;
<http://flexikon.doccheck.com/de/Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase>
- URL-55 (05.10.2014) Chi-Quadrat-Test auf Unabhängigkeit zwischen zwei kategorialen Merkmalen.
<http://www.univie.ac.at/soziologie-statistik/soz/daten/chi-quadrat.pdf>
- URL-56 (04.10.2014) Medizinische Statistik (medistat) | Datenanalyse & Statistische Beratung für Fachbereiche der Medizin; von Hehn, Ulrike; http://medistat.de/statistikberatung-glossar-artikel.php?id=Rangkorrelationskoeffizient_nach_Spearman

URL-57 (04.10.2014) Hochschule Luzern; Mann-Whitney-U; <http://www.empirical-methods.hslu.ch/h-mann-whitney-u.htm>; Quelle: Gravetter, F. J. & Wallnau, L. B. (2009). Statistics for the behavioral sciences. Belmont: Wadsworth Cengage Learning.

URL-58 (13.10.2014) GanzImmun – Labor für funktionelle Medizin AG; p53-Autoantikörper in der Tumordiagnostik; Fachinformation 0012

URL:

http://www.google.de/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CCEQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.ganzimmun.de%2Fseiten%2Fdownload_file.php%3Fdownload_id%3D416&ei=F3M9VNGJIoS9yGOLl4GIAw&usg=AFQjCNEL2SbcCFMiZEagCvDfBV48R9K3oA&bvm=bv.77412846,d.bGQ

URL-59 (13.10.2014)<http://frauenheilkunde-innsbruck.uklibk.ac.at/page.cfm?vpath=index/forschung/projekte>

wissenschaftliche Fachliteratur

Ausubel, Frederick M. (2002) Short protocols in molecular biology; Wiley Verlag, New York; 5. Auflage; ISBN: 9780471250920

Beck, Stephen V.; Olek, A. (2003) The epigenome - Molecular hide and seek. Wiley-VCH, Weinheim, 178; ISBN: 9783527304943

Döderlein, Bernhard Krönig, Carl Menge u. d. Hrsg. Otto Küstner, Bearb. v. Ernst Bumm, Albert (1912) Kurzes Lehrbuch der Gynäkologie. Mit 384 teils farb. Abbildungen im Text.; 5., neu bearb. Aufl.; Jena; XIV, 633 S., Abb., 25 cm. Leinen

Dudenhausen, Joachim W. (2003) Frauenheilkunde und Geburtshilfe, 2. Auflage, de Gruyter-Verlag, Berlin, XVIII, 670 S.; Seite 378-381; ISBN: 9783110165623

Fuchs, Georg; Schlegel, Hans G.; Eitinger, Thomas (2007) Allgemeine Mikrobiologie – 53 Tabellen.; Thieme-Verlag, Stuttgart; 8., vollst. überarb. und erw. Aufl.; XX, 678 S.; ISBN: 3134446081

Graumann, Walther; Sasse, Dieter (2003) CompactLehrbuch Anatomie; Schattauer-Verlag, Stuttgart; ISBN: 9783794520626

Hallbach, Jürgen (2006) Klinische Chemie und Hämatologie für den Einstieg [mit Hämatologie und Hämostaseologie] : 175 Tabellen; Thieme-Verlag, Stuttgart; 2., überarb. Auflage; XIX, 495 S.; ISBN: 9783131063427; Seiten: 218-219

Hütter, Gero (2013) Epigenetische Veränderung der akuten lymphatischen Leukämie - Untersuchung der DNA-Methylierung Zellzyklus- und differenzierungsrelevanter Gene als mögliche Prognosefaktoren der akuten lymphatischen Leukämie ; Diplomica Verlag GmbH, Hamburg; ISBN: 3842899424, 9783842899421; Seiten: 20-23

Knippers (2006) Molekulare Genetik - 68 Tabellen; Georg Thieme Verlag, Stuttgart; 9., kompl. überarb. Auflage; ISBN: 9783134770094; Seiten 531-537

Kück, Ulrich (2005) Praktikum der Molekulargenetik. mit 40 Tabellen; Springer-Verlag, Berlin; ISBN: 3540211667

Lang, Gudrun (2006) Histotechnik - Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik; Springer-Verlag, Wien, New York; ISBN: 3211331417

Linß, Werner; Fanghänel, Jochen (1999) Histologie - Zytologie, allgemeine Histologie, mikroskopische Anatomie; de Gruyter-Verlag, Berlin; XVI, 345 S.; ISBN: 9783110140323; Seiten: 132-133

(2008) Long-Range Control of Gene Expression.

Müller, Oliver; Wagener, Christoph (2009) Molekulare Onkologie; Thieme-Verlag; 3., komplett aktualisierte und erweiterte Auflage; ISBN: 3131035137

Nicolaus, K.; Häfner, H.; Weiss, S.; Dürst, M.; Runnebaum, I. B. (2013) p53-Autoantikörper-Marker für Therapieerfolg und Krankheitsverlauf bei Ovarialkarzinom-Patientinnen?; Bandnr. der Reihe 73

Rassow, Joachim (2006) Biochemie – 50 Tabellen; Thieme-Verlag, Stuttgart; XXX, 836 S.; ISBN: 9783131253514

(1987) Recombinant DNA Part F.

Scully, Robert E.; Sobin, L. H.; Serov, S. F. (1999) Histological typing of ovarian tumours; Springer-Verlag, Berlin, New York; 2. Auflage; ISBN: 9783540640592

Wagener, Christoph; Müller, Oliver (2009) Molekulare Onkologie - Entstehung, Progression, klinische Aspekte; 95 Tabellen; Georg Thieme Verlag, Stuttgart; 3., komplett aktualisierte und erw. Aufl.; ISBN: 3131035137; Seiten: 49-50

Zilles, Karl; Tillmann, Bernhard (2010) Anatomie – mit 121 Tabellen; Springer-Medizin-Verl., Heidelberg; XV, 1022 S.; ISBN: 3540694811; Seite: 371

Buchbeitrag

Seidman, Jeffrey D.; Cho, Kathleen R.; Ronnett, Brigitte M.; Kurman, Robert J. (2011) Surface Epithelial Tumors of the Ovary ; Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract.; Seiten: 679–784; DOI: 10.1007/978-1-4419-0489-8_14

wissenschaftliche Arbeiten: Dissertationen, Master-Arbeiten o. Ä.

Dr. med. Gülten Oskay () Aktuelle Aspekte der Behandlung und Nachsorge von Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom.

Dr. rer. nat. Norman Häfner () Physikalischer Status des HPV16 Genoms und die virale Onkogenexpression – Bedeutung für die Zervixkarzinogenese.

Maria Thannhäuser () „Promotorhypermethylierung und Expression des DNA-Reparaturgens MGMT in oligodendroglialen Tumoren“.

Sewing M () Der Einfluss von p53 medierter genetischer Instabilität auf die Entstehung von PIK3CA-Amplifikationen in malignen Ovarialtumoren.93

Aufsatz

Biel, Wascholowski & Giannis (2005) Epigenetik - ein Epizentrum der Genregulation: Histone und histonmodifizierende Enzyme. Angewandte Chemie 21 3248–3280

wissenschaftliche Veröffentlichungen

1. Aarnio Markku, Sankila Risto, Pukkala Eero, Salovaara Reijo, Aaltonen Lauri A., de la Chapelle Albert, Päivi Peltomäki, Jukka-Pekka Mecklin, Järvinen Heikki J. (1999) Cancer risk in mutation carriers of DNA-mismatch-repair genes 214–218
2. Ahmed, Etemadmoghadam & Temple et al. (2010) Driver mutations in TP53 are ubiquitous in high grade serous carcinoma of the ovary. The Journal of pathology 1 49–56
3. [Anastasi E, et al. 2010]: HE4: a new potential early biomarker for the recurrence of ovarian cancer. Tumour Biol. 2010;31:113
4. Auersperg (2001) Ovarian Surface Epithelium: Biology, Endocrinology, and Pathology. Endocrine Reviews 2 255–288
5. Ballestar & Esteller ((2008)) Chapter 9 Epigenetic Gene Regulation in Cancer Elsevier 61 247–267
6. Barber RD, Harmer DW, Coleman RA, Clark BJ. (2005) GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. Physiol Genomics 11;21(3):389-95
7. Barrette, Srivatsa & Cliby et al. (1997) Overexpression of p34 cdc2 Protein Kinase in Epithelial Ovarian Carcinoma. Mayo Clinic Proceedings 10 925–929
8. Bates, S. & Vousden, K. H. (1996) p53 in signaling checkpoint arrest or apoptosis. Curr. Opin. Genet. Dev. 6 12–19
9. Baylin & Jones (2011) A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications. Nature reviews. Cancer 10 726–734
10. Benchimol, Lamb & Crawford et al. (1985) Transformation associated p53 protein is encoded by a gene on human chromosome 17. Somatic Cell and Molecular Genetics 5 505–510

11. Beral (2007) Ovarian cancer and hormone replacement therapy in the Million Women Study. *The Lancet* 9574 1703–1710
12. Bertheau, Espié & Turpin et al. (2008) TP53 status and response to chemotherapy in breast cancer. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology* 2 132–139
13. Bestor TH (2000) The DNA methyltransferases of mammals. *Hum. Mol. Genet.* 9(16) 2395–2402
14. Birnboim (1983) A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. 100, 243 – 255. *Methods in Enzymology* 100 243–255
15. Birnboim, H. C. and J. Doly (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *NAR* 7
16. Boulton (2006) Cellular functions of the BRCA tumour-suppressor proteins. *Biochemical Society transactions Pt 5* 633–645 Bourdon, Fernandes & Murray-Zmijewski et al. (2005) p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes & development* 18 2122–2137
17. Bourdon JC (2007) p53 and its isoforms in cancer. *Br J Cancer. Br. J. Cancer* 97 277–282
18. Brawerman, Mendecki & Lee (1972) Isolation of mammalian messenger ribonucleic acid. *Biochemistry* 4 637–641
19. Bristow RE, Tomacruz RS, Armstrong DK, Trimble EL, Montz FJ (2002) Survival effect of maximal cytoreductive surgery for advanced ovarian carcinoma during the platinum era: a meta-analysis. *J Clin Oncol* 20 1248–1259
20. Capen (2004) Mechanisms of Hormone-Mediated Carcinogenesis of the Ovary. *Toxicologic Pathology* 5 1–5
21. Cass, Baldwin & Varkey et al. (2003) Improved survival in women with BRCA-associated ovarian carcinoma. *Cancer* 9 2187–2195
22. Chen RZ, Petterson U, Beard C et al. (1998) DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. *Nature* 395(6697) 89–93
23. Chene, Lamblin & Le Bail-Carval et al. (2014) Early preinvasive lesions in ovarian cancer. *BioMed research international* 639252
24. Choi (2002) Follicle-Stimulating Hormone Activates Mitogen-Activated Protein Kinase in Preneoplastic and Neoplastic Ovarian Surface Epithelial Cells. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 5 2245–2253
25. Christie M, Oehler MK (2006) Molecular pathology of epithelial ovarian cancer. *J Br Menopause Soc (The journal of the British Menopause Society British Menopause Society)* 12
26. Colgan, Murphy & Cole, David E. C. et al. (2001) Occult Carcinoma in Prophylactic Oophorectomy Specimens. *The American Journal of Surgical Pathology* 10 1283–1289
27. de Graeff P, Crijns AP, de Jong S, Boezen M, Po st WJ, de Vries EG, van der Zee AG, de Bock GH (2009) Modest effect of p53, EGFR and HER-2/neu on prognosis in epithelial ovarian cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer* 101 149–159
28. Dubeau (1999) The cell of origin of ovarian epithelial tumors and the ovarian surface epithelium dogma: does the emperor have no clothes? *Gynecologic oncology* 3 437–442
29. Dubeau (2008) The cell of origin of ovarian epithelial tumours. *The Lancet Oncology* 12 1191–1197
30. Duggan & Dubeau (1998) Genetics and biology of gynecologic cancer. *Current Opinion in Oncology* 5 439–446
31. Eds. Ausubel, F. M. et al. () *Current Protocols in Molecular Biology - Nukleobond - Handbuch.*
32. Fathalla (1971) INCESSANT OVULATION—A FACTOR IN OVARIAN NEOPLASIA ? *The Lancet* 7716 163
33. Finch, Beiner & Lubinski et al. (2006) Salpingo-oophorectomy and the risk of ovarian, fallopian tube, and peritoneal cancers in women with a BRCA1 or BRCA2 Mutation. *JAMA* 2 185–192
34. Fleming, Beaugié & Haviv et al. (2006) Incessant ovulation, inflammation and epithelial ovarian carcinogenesis: revisiting old hypotheses. *Molecular and cellular endocrinology* 1-2 4–21
35. Frank TS, Bartos RE, Haefner HK, Roberts JA, Wi lson MD, Hubbell GP (1994) Loss of heterozygosity and overexpression of the p53 gene in ovarian carcinoma. *Mod Pathol* 7 3–8

36. Gadducci, Cosio & Gargini et al. (2004) Sex-steroid hormones, gonadotropin and ovarian carcinogenesis: a review of epidemiological and experimental data. *Gynecological Endocrinology* 4 216–228
37. Gemignani, Schlaerth & Bogomolnii et al. (2003) Role of KRAS and BRAF gene mutations in mucinous ovarian carcinoma. *Gynecologic Oncology* 2 378–381
38. Gershenson, Sun & Lu et al. (2006) Clinical behavior of stage II-IV low-grade serous carcinoma of the ovary. *Obstetrics and gynecology* 2 361–368
39. Graßmann & Deffner (1953) Verteilungschromatographisches Verhalten von Proteinen und Peptiden in phenolhaltigen Lösungsmitteln. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie Jahresband* 89–98
40. Güth, Huang & Bauer et al. (2007) Metastatic patterns at autopsy in patients with ovarian carcinoma. *Cancer* 6 1272–1280
41. Gwinn, Lee & Rhodes et al. (1990) Pregnancy, breast feeding, and oral contraceptives and the risk of epithelial ovarian cancer. *Journal of Clinical Epidemiology* 6 559–568
42. Hanahan & Weinberg (2000) The Hallmarks of Cancer. *Cell* 1 57–70
43. Harris CC (1993) p53: at the crossroads of molecular carcinogenesis and risk assessment. *Science* 262 1980–1981
44. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R (1992) Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Bio/Technology* 10: 413–417
45. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC (1991) p53 mutations in human cancers. *Science* 253 49–53
46. Iggo R, Gatter K, Bartek J, Lane D, Harris AL (1990) Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. *Lancet* 335 675–679
47. Ignacio Romero and Robert C. Bast, Jr. (2012) Minireview: Human Ovarian Cancer: Biology, Current Management, and Paths to Personalizing Therapy. *Endocrinology* 153(4) 1593–1602
48. Isobe, Emanuel & Givol et al. (1986) Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. *Nature* 6057 84–85
49. Jaenisch & Bird (2003) Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature genetics* 245–254
50. Jazaeri (2002) Gene Expression Profiles of BRCA1-Linked, BRCA2-Linked, and Sporadic Ovarian Cancers. *CancerSpectrum Knowledge Environment* 13 990–1000
51. Jemal, Siegel & Ward et al. (2007) Cancer Statistics, 2007. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 1 43–66
52. Jiang X, Morland SJ, Hitchcock A, Thomas EJ, Campbell IG (1998) Allelotyping of endometriosis with adjacent ovarian carcinoma reveals evidence of a common lineage. *Cancer research*
53. Jones, Wang & Shih et al. (2010) Frequent mutations of chromatin remodeling gene ARID1A in ovarian clear cell carcinoma. *Science (New York, N.Y.)* 6001 228–231
54. Kindelberger, Lee & Miron et al. (2007) Intraepithelial carcinoma of the fimbria and pelvic serous carcinoma: Evidence for a causal relationship. *The American journal of surgical pathology* 2 161–169
55. Kirby KS (1956) A new method for the isolation of ribonucleic acids from mammalian tissues. *Biochem. J.* 64:405
56. Kmet LM, Cook LS, Magliocco AM (2003) A review of p53 expression and mutation in human benign, low malignant potential, and invasive epithelial ovarian tumors. *Cancer* 97 389–404
57. Ko & Prives (1996) p53: puzzle and paradigm. *Genes & Development* 9 1054–1072
58. Kohler MF, Kerns BJ, Humphrey PA, Marks JR, Bast RC, Jr., Berchuck A (1993) Mutation and overexpression of p53 in early-stage epithelial ovarian cancer. *Obstet Gynecol* 81 643–650
59. Kupryjanczyk, Thor & Beauchamp et al. (1993) p53 gene mutations and protein accumulation in human ovarian cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 11 4961–4965
60. Kurman & Shih (2010) The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory. *The American journal of surgical pathology* 3 433–443

61. Kurman & Shih (2011) Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer--shifting the paradigm. *Human pathology* 7 918–931
62. Kurman, Visvanathan & Roden et al. (2008) Early detection and treatment of ovarian cancer: shifting from early stage to minimal volume of disease based on a new model of carcinogenesis. *American journal of obstetrics and gynecology* 4 351–356
63. Landen, Birrer & Sood (2008) Early events in the pathogenesis of epithelial ovarian cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 6 995–1005
64. Landen & Klingelhutz (2004) Genomic instability is associated with lack of telomerase activation in ovarian cancer. *Cancer Biology & Therapy* 12 1250–1253
65. LANE (1992) Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 6381 15–16
66. LANE & Crawford (1979) T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 5701 261–263
67. Leeper, Garcia & Swisher et al. (2002) Pathologic Findings in Prophylactic Oophorectomy Specimens in High-Risk Women. *Gynecologic Oncology* 1 52–56
68. Leonard A. Herzenberg, David Parks, Bitu Sahaf, Omar Perez, Mario Roederer and Leonore A. Herzenberg (Oktober 2002) The History and Future of the Fluorescence Activated Cell Sorter and Flow Cytometry: A View from Stanford. *Clinical Chemistry* 1819–1827
69. Levine AJ (1989) The p53 tumor suppressor gene and gene product. *Princess Takamatsu Symp* 20 221–230
70. Levine AJ, Momand J, Finlay CA (1991) The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 351 453–456.
71. Levine, Argenta & Yee et al. (2003) Fallopian tube and primary peritoneal carcinomas associated with BRCA mutations. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 22 4222–4227
72. Li Z, Yang L, Wang J, Shi W, Pawar RA, Liu Y, Xu C, Cong W, Hu Q, Lu T, Xia F, Guo W, Zhao M, Zhang Y. (2010, Juli) beta-Actin is a useful internal control for tissue-specific gene expression studies using quantitative real-time PCR in the half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* challenged with LPS or *Vibrio anguillarum*. *Fish Shellfish Immunol.* 2010.02.021
73. Linzer DI, Levine AJ (1979) Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 17
74. Liu, Midgley & Stephen et al. (2001) Biological significance of a small highly conserved region in the N terminus of the p53 tumour suppressor protein. *Journal of molecular biology* 4 711–731
75. Loeb LA (1991) Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Research* 51 3075–3079
76. Marks JR, Davidoff AM, Kerns BJ, Humphrey PA, Pence JC, Dodge RK, Clarke-Pearson DL, Iglehart JD, Bast RC Jr, Berchuck A (1991) Overexpression and mutation of p53 in epithelial ovarian cancer. *Cancer research*
77. Melin, Sparén & Persson et al. (2006) Endometriosis and the risk of cancer with special emphasis on ovarian cancer. *Human reproduction (Oxford, England)* 5 1237–1242
78. Michalovitz, Halevy & Oren (1991) p53 mutations: gains or losses? *Journal of cellular biochemistry* 1 22–29
79. Mok, Kwong & Welch et al. (2007) Etiology and Pathogenesis of Epithelial Ovarian Cancer. *Disease Markers* 5-6 367–376
80. Momparler (2003) Cancer epigenetics. *Oncogene* 42 6479–6483
81. Müller M, Schleithoff ES, Stremmel W, Melino G (2006) One, two, three - p53, p63, p73 and chemosensitivity. *Drug Resist Updat* 9 288–306
82. Mullis & Faloona ((1987)) [21] Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction *Elsevier* 155 335–350
83. Mullis KB (December 8, 1993) The polymerase chain reaction. *Nobel Lecture*
84. Ness & Cottreau (1999) Possible Role of Ovarian Epithelial Inflammation in Ovarian Cancer. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 17 1459–1467
85. Nowell (1976) The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 4260 23–28

86. Olivier, van Beurden & Lubsen, M A C et al. (2004) Clinical outcome of prophylactic oophorectomy in BRCA1/BRCA2 mutation carriers and events during follow-up. *British journal of cancer* 8 1492–1497
87. Oren M, Maltzman W, Levine AJ (1981) Post-translational regulation of the 54K cellular tumor antigen in normal and transformed cells. *Mol Cell Biol* 1 101–110
88. Parazzini F, La Vecchia C, Negri E, et al. (1996) Pelvic inflammatory disease and risk of ovarian cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 5
89. Permuth-Wey & Sellers (2009) Epidemiology of ovarian cancer. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 413–437
90. Piek, van Diest, P J & Zweemer et al. (2001) Dysplastic changes in prophylactically removed Fallopian tubes of women predisposed to developing ovarian cancer. *The Journal of pathology* 4 451–456
91. Pienta KJ, Partin AW, Coffey DS (1989) Cancer as a disease of DNA organization and dynamic cell structure. *Cancer Res* 49 2525–2532
92. Poremba, Heine & Diallo et al. (2002) Telomerase as a prognostic marker in breast cancer: high-throughput tissue microarray analysis of hTERT and hTR. *The Journal of pathology* 2 181–189
93. Ramsahoye, Biniszkievicz & Lyko et al. (2000) Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 10 5237–5242
94. Reich NC, Oren M, Levine AJ (1983) Two distinct mechanisms regulate the levels of a cellular tumor antigen, p53. *Mol Cell Biol* 3 2143–2150
95. Reidhaar-Olson JF, Hammer J (April 2011) The impact of genomics tools on target discovery. *Curr Drug Discovery*
96. Rideout WM III, Coetzee GA, Olumi AF et al. (1990) 5-Methylcytosine as an endogenous mutagen in the human LDL receptor and p53 genes. *Science* 249(4974) 1288–1289
97. Riman (2002) Risk Factors for Invasive Epithelial Ovarian Cancer: Results from a Swedish Case-Control Study. *American Journal of Epidemiology* 4 363–373
98. Risch HA, Weiss NS, Lyon JL, Daling JR, Liff JM (1983) Events of reproductive life and the incidence of epithelial ovarian cancer. *American Journal for Epidemiology* 129–139
99. Rosen, Fan & Pestell et al. (2003) BRCA1 gene in breast cancer. *Journal of cellular physiology* 1 19–41
100. Sanger, Nicklen & Coulson (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 12 5463–5467
101. SCHILDKRAUT (1996) Epithelial Ovarian Cancer Risk Among Women With Polycystic Ovary Syndrome. *Obstetrics & Gynecology* 4 554–559
102. Seidman & Khedmati (2008) Exploring the histogenesis of ovarian mucinous and transitional cell (Brenner) neoplasms and their relationship with Walthard cell nests: a study of 120 tumors. *Archives of pathology & laboratory medicine* 11 1753–1760
103. Selivanova & Wiman (2007) Reactivation of mutant p53: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Oncogene* 15 2243–2254
104. Senturk, Cohen & Dottino et al. (2010) A critical re-appraisal of BRCA1 methylation studies in ovarian cancer. *Gynecologic oncology* 2 376–383
105. Shih & Kurman (2004) Ovarian Tumorigenesis- a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *The American Journal of Pathology* 5 1511–1518
106. Skilling, Squatrito & Connor et al. (1996) p53 gene mutation analysis and antisense-mediated growth inhibition of human ovarian carcinoma cell lines. *Gynecologic oncology* 1 72–80
107. Solomon E, Borrow J, Goddard AD (1991) Chromosome aberrations and cancer. *Science* 254 1153–1160
108. Soslow (2008) Histologic subtypes of ovarian carcinoma: an overview. *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists* 2 161–174

109. Soussi T, Beroud C (2001) Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 1 233-240.
110. Soussi T, Ishioka C, Claustres M, Beroud C (2006) Locus-specific mutation databases: pitfalls and good practice based on the p53 experience. *Nat Rev Cancer* 6 83-90.
111. Sui, Dong & Ohno et al. (2001) Implication of malignancy and prognosis of p27(kip1), Cyclin E, and Cdk2 expression in epithelial ovarian tumors. *Gynecologic oncology* 1 56-63
112. Temin HM (1988) Evolution of cancer genes as a mutation-driven process. *Cancer Research* 48 1697-1701
113. Thierry Soussi (2000) p53 Antibodies in the Sera of Patients with Various Types of Cancer: A Review. *Journal of Cancer Research*
114. Toledo F, Wahl GM (2009) Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat Rev Cancer* 9 909-923
115. Tortolero-Luna & Mitchell (1995) The epidemiology of ovarian cancer. *Journal of cellular biochemistry* 52 200-207
116. Venkitaraman (2002) Cancer Susceptibility and the Functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell* 110 171-182
117. Wang E, Ngalmé Y, Panelli MC, Nguyen-Jackson H, Deavers M, Mueller P, Hu W, Savary CA, Kobayashi R, Freedman RS, Marincola FM (2005) Peritoneal and subperitoneal stroma may facilitate regional spread of ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.* 11 113-122
118. Vogelstein, Lane & Levine (2000) Surfing the p53 network. *Nature* 408 307-310
119. Vogelstein B, Kinzler KW (1994) Tumour-suppressor genes. X-rays strike p53 again. *Nature* 370
120. Vousden & Lane (2007) p53 in health and disease. *Nature reviews. Molecular cell biology* 4 275-283
121. Wang PH (2004) Androgens and ovarian cancers. *Eur J Gynaecol Oncol. (European Journal of Gynaecological Oncology)* 25 157-163
122. Whibley, Pharoah, Paul D P & Hollstein (2009) p53 polymorphisms: cancer implications. *Nature reviews. Cancer* 9 95-107
123. Wiegand, Shah & Al-Agha et al. (2010) ARID1A mutations in endometriosis-associated ovarian carcinomas. *The New England journal of medicine* 362 1532-1543
124. Willner, Wurzel & Allison et al. (2007) Alternate molecular genetic pathways in ovarian carcinomas of common histological types. *Human pathology* 4 607-613
125. Wu GS, El-Diery WS (1996) p53 and chemosensitivity. *Nat Med* 2 255-256
126. Xu Y (2008) Induction of genetic instability by gain-of-function p53 cancer mutants. *Oncogene* 27 3501-3507
127. Yang, Rosen & Mercado-Urbe et al. (2007) Knockdown of p53 combined with expression of the catalytic subunit of telomerase is sufficient to immortalize primary human ovarian surface epithelial cells. *Carcinogenesis* 28 174-182
128. Yoshida & Miki (2004) Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Science* 115 866-871
129. Zhou & Liu (2003) Inhibition of human telomerase reverse transcriptase gene expression by BRCA1 in human ovarian cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 301 130-136

Arbeitsanleitungen/Protokolle

Greiner bio-one Leucosep - Gebrauchsanleitung (163 288, 163 289, 163 290, 227 288, 227 289, 227 290).

Anhang

Immunhistochemie an einer klinischen Probe (TB-Nr. 8335)

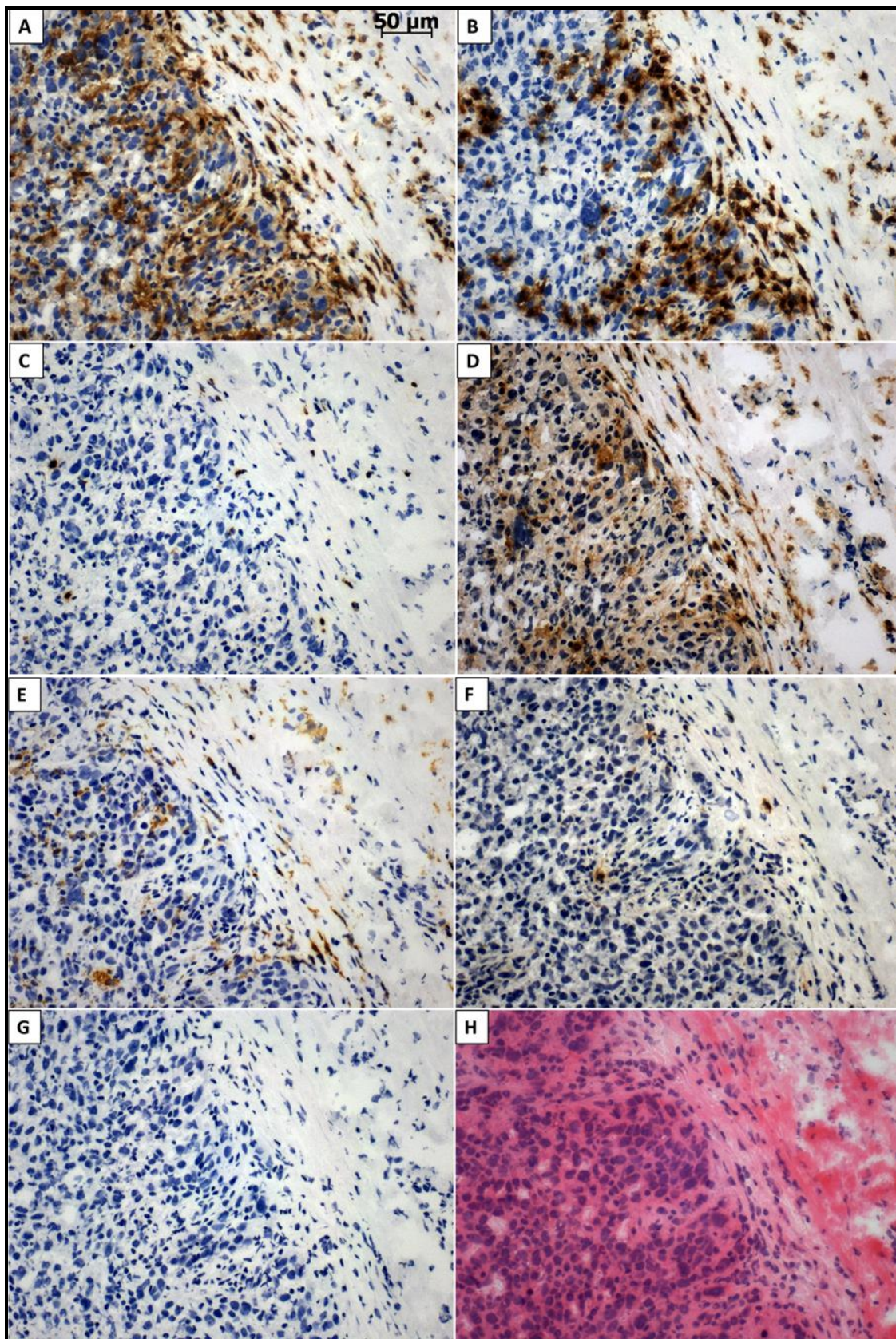


Abbildung 53 immunhistochemische Färbung (gesamtes Färbungsset) an einer OvCa-Gewebeprobe:
 A CD4 (T-Helferzellen); B CD8 (zytotoxische T-Zellen); C FoxP3 (regulatorische T-Zellen); D CD14 (unspezifische Färbung Makrophagen);
 E CD163 (Makrophagen); F CD20 (B-Zellen); G Negativkontrolle; H HE-Färbung. Vergrößerung: 20x

Immunzell-Verhältnisse der einzelnen untersuchten Populationen zueinander

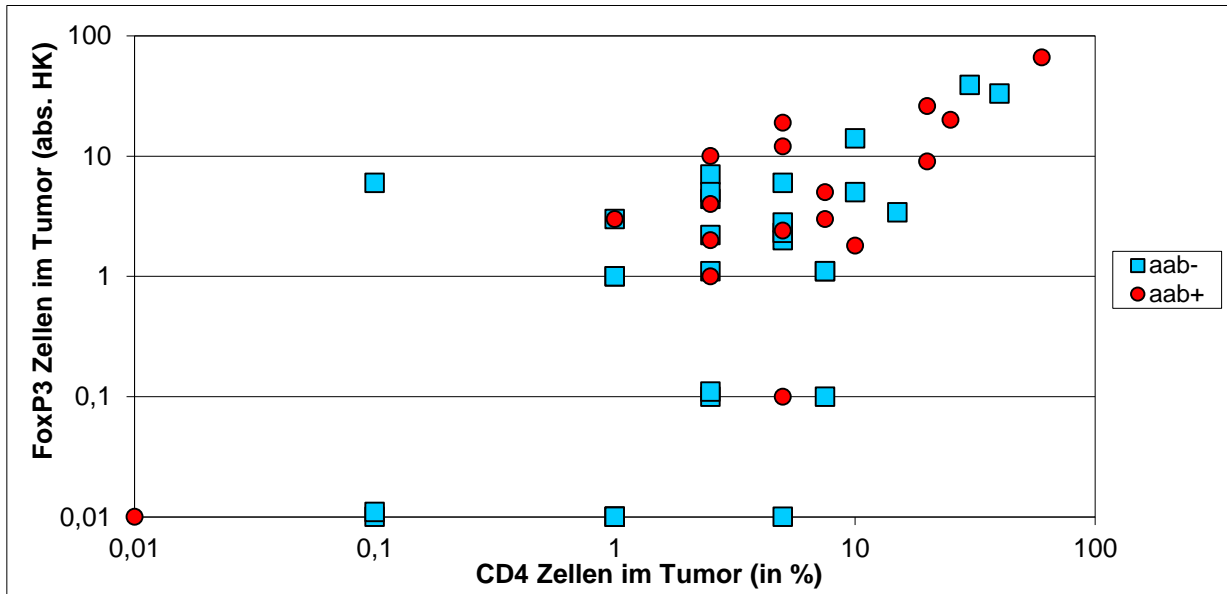
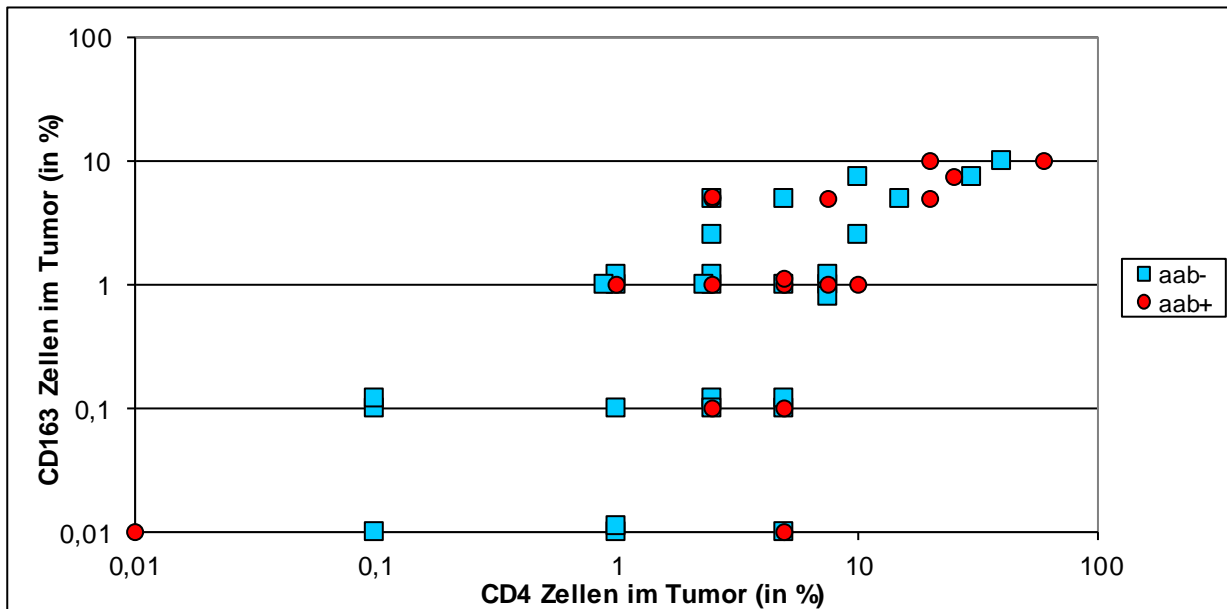


Abbildung 54 Immunzell-Verhältnis: CD4 zu FoxP3



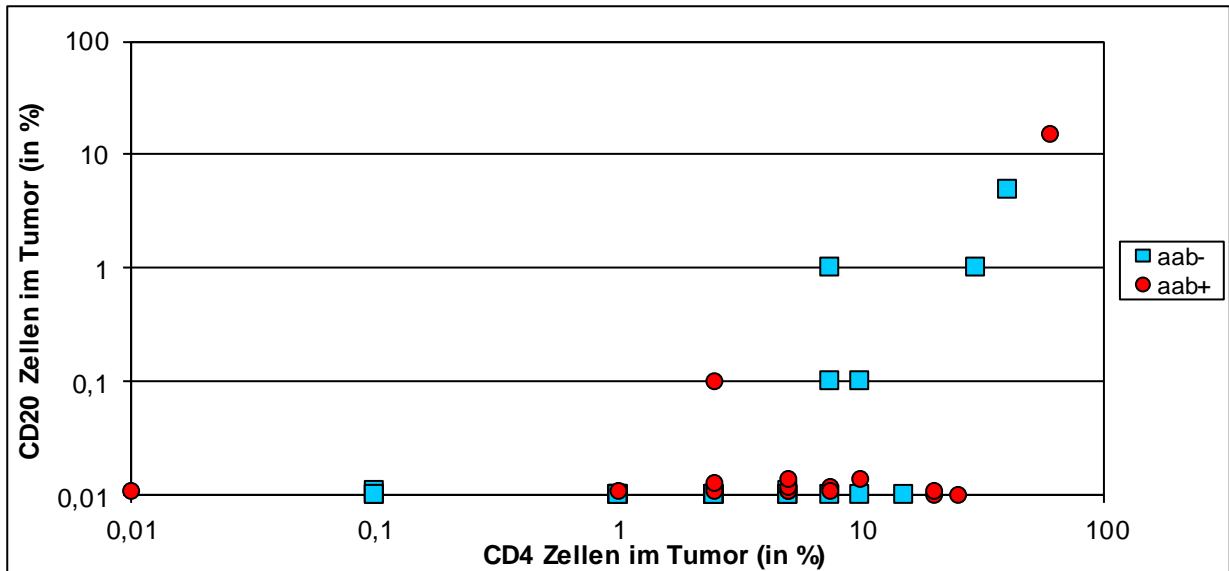
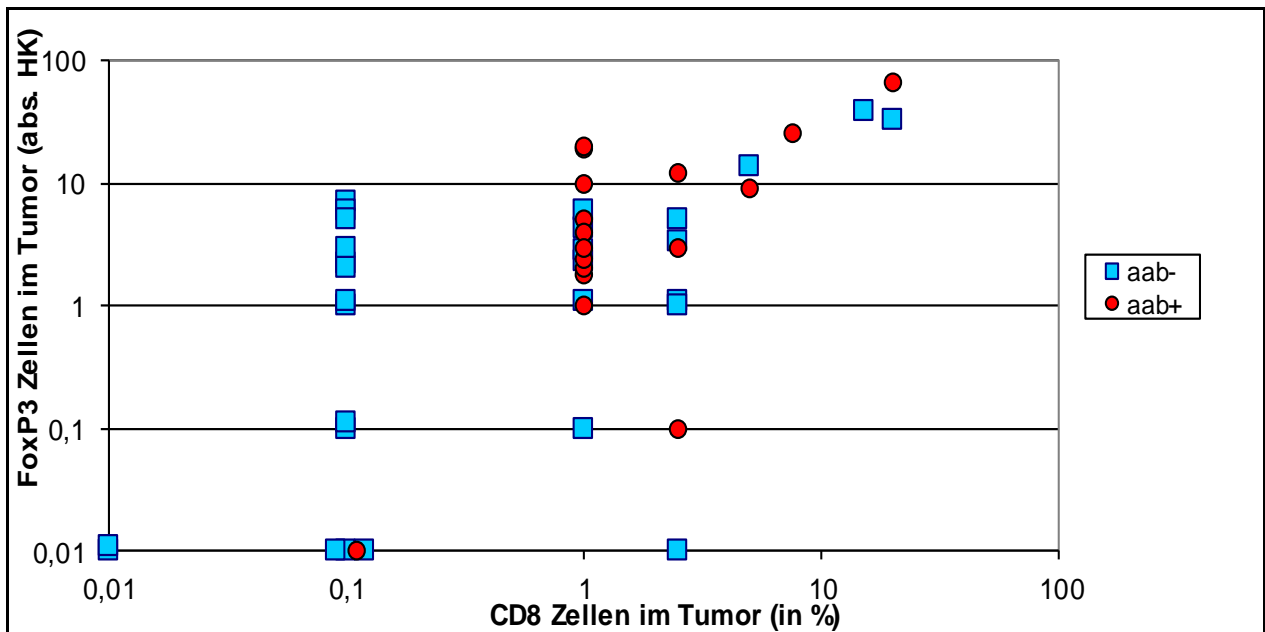


Abbildung 56 Immunzell-Verhältnis: CD4 zu CD20



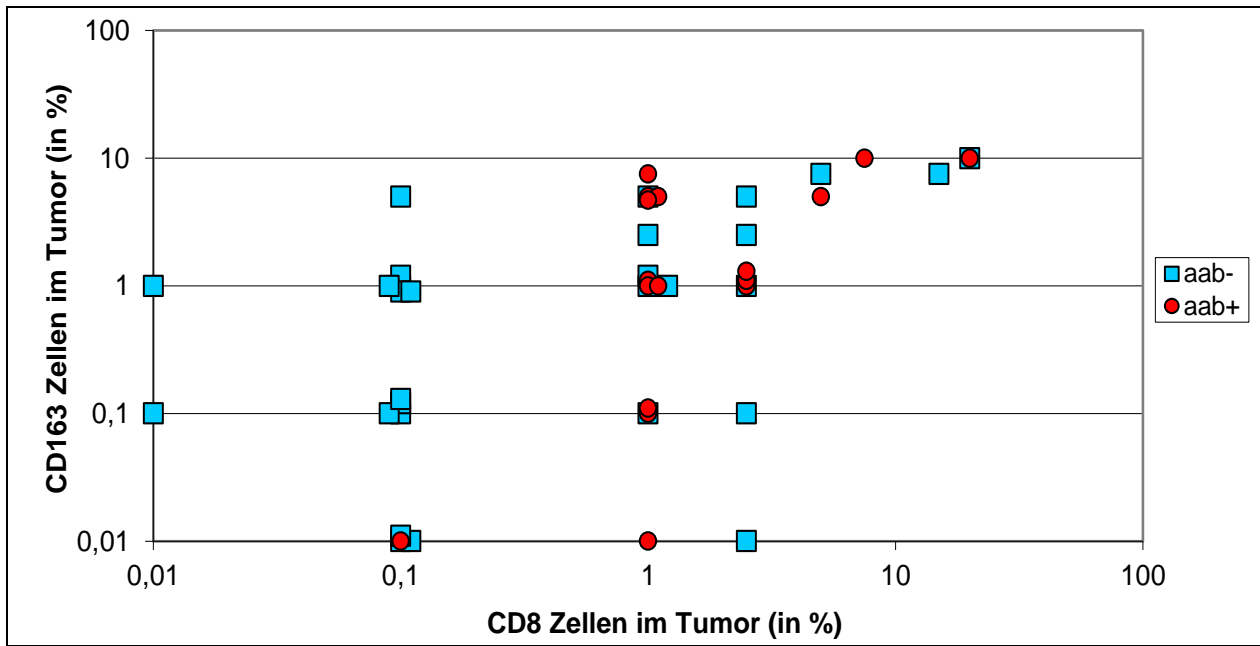


Abbildung 58 Immunzell-Verhältnis: CD8 zu CD163

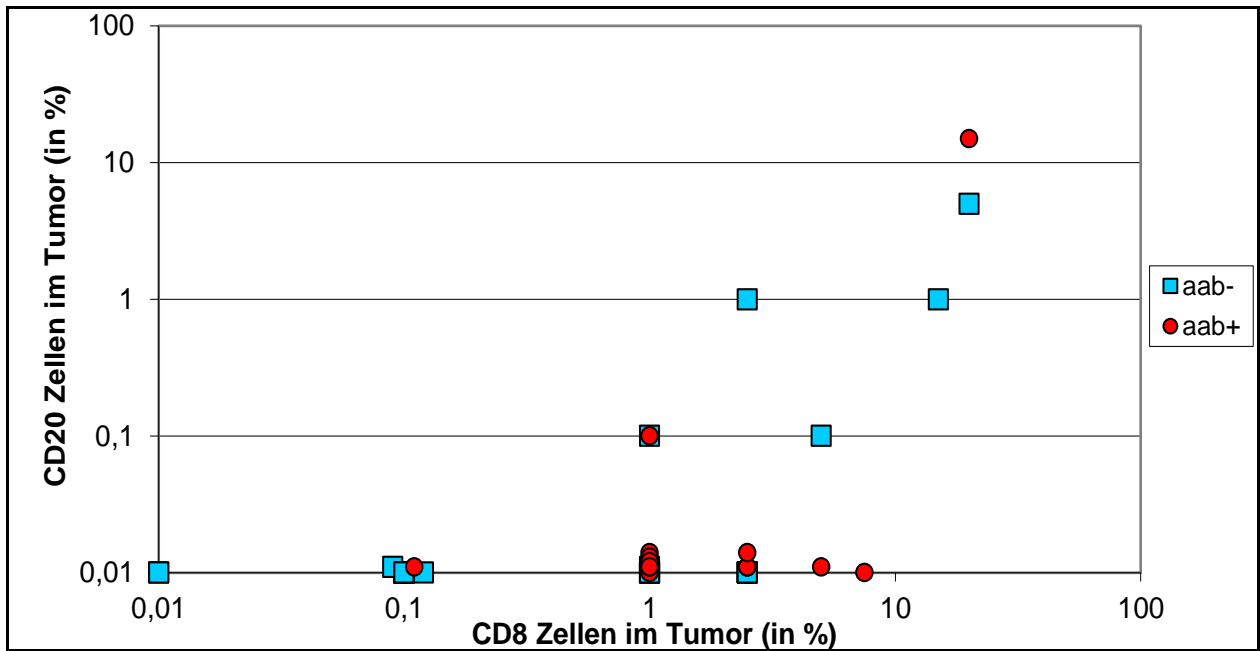


Abbildung 59 Immunzell-Verhältnis: CD8 zu CD20

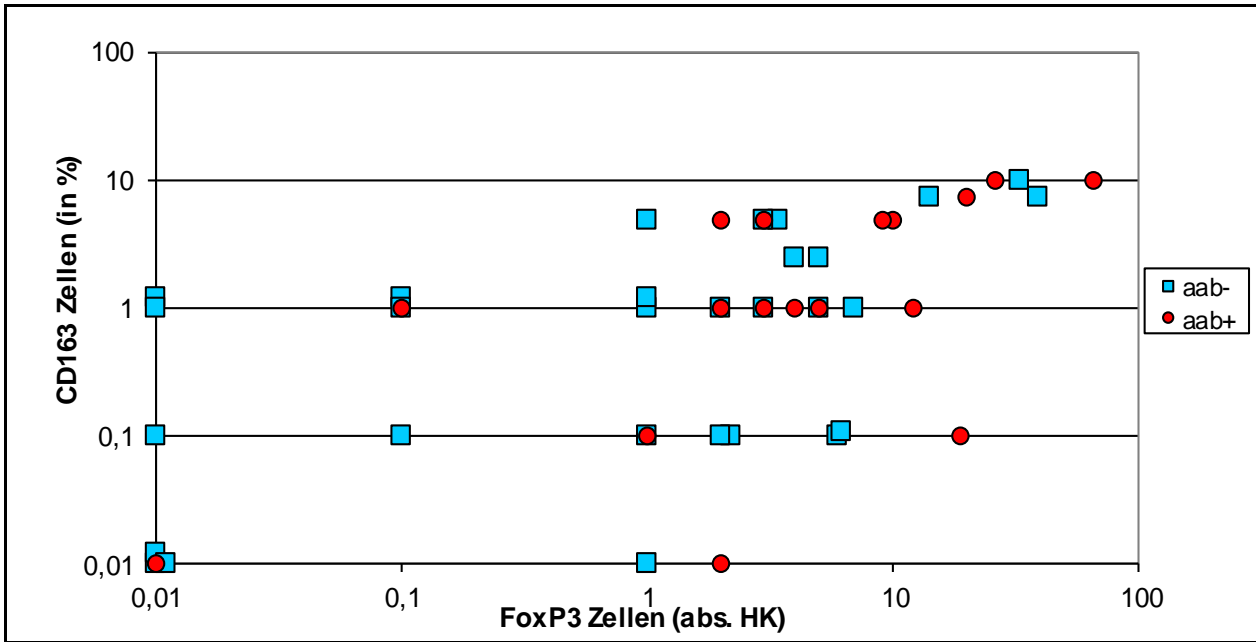


Abbildung 60 Immunzell-Verhältnis: FoxP3 zu CD163

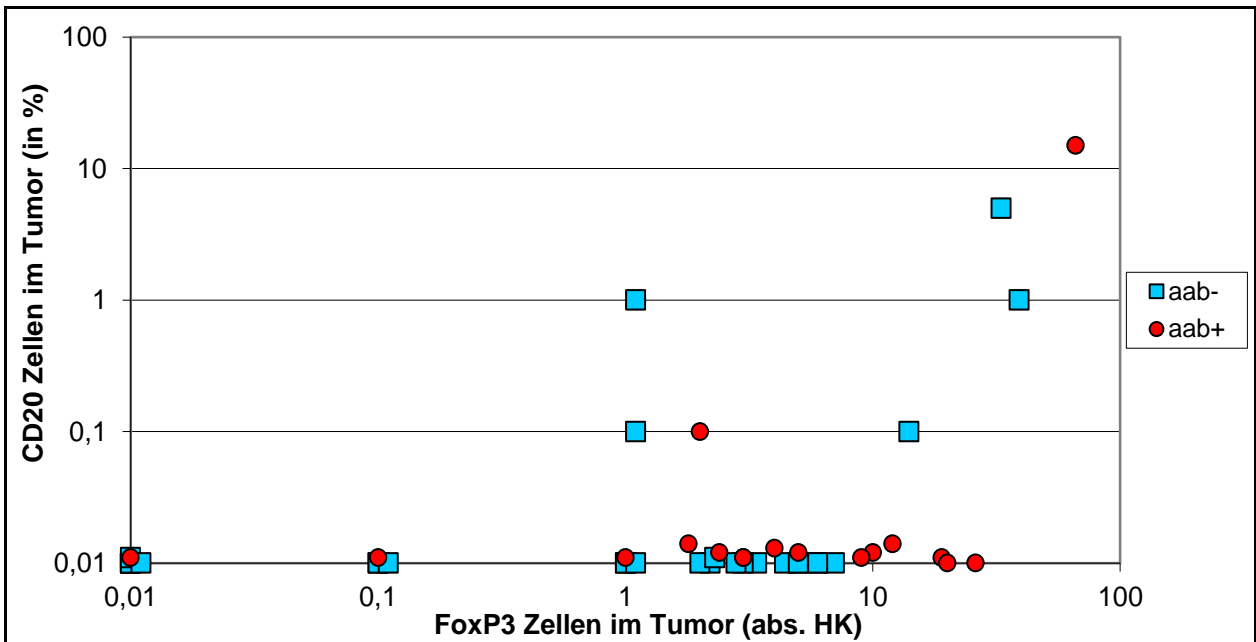


Abbildung 61 Immunzell-Verhältnis: FoxP3 zu CD20

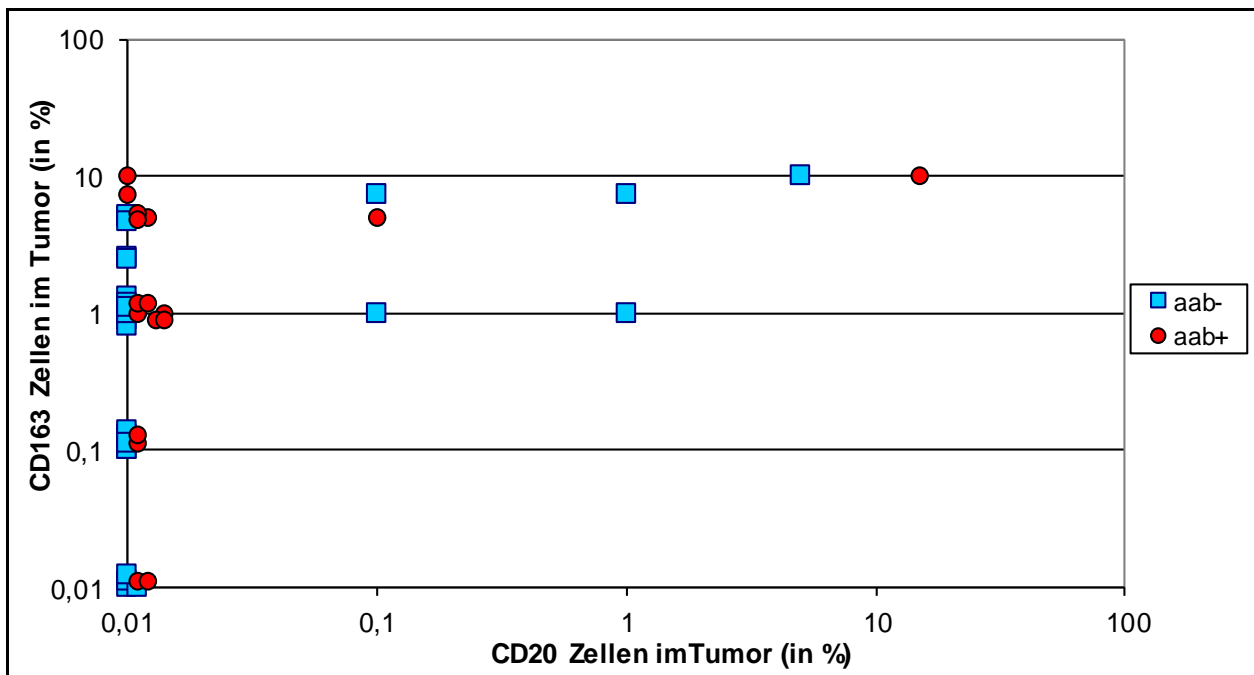


Abbildung 62 Immunzell-Verhältnis: CD20 zu CD163

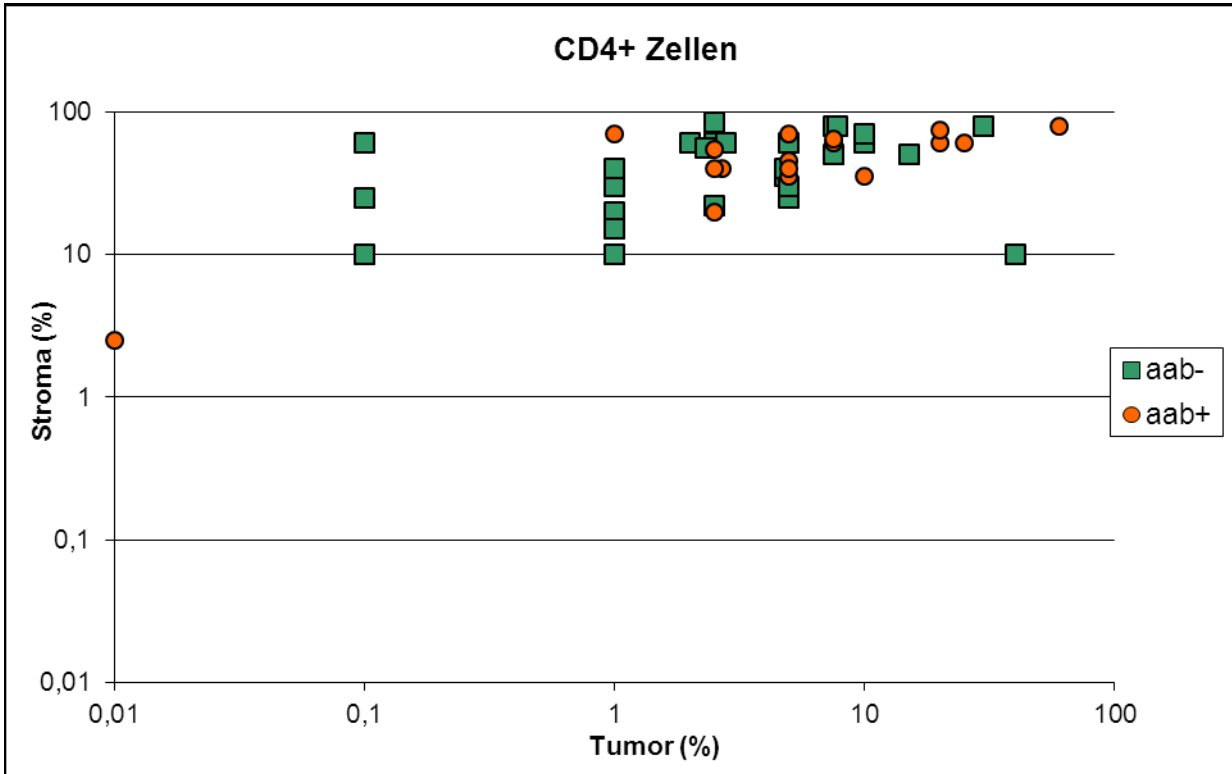
Verhältnis der gefärbten Immunzellen zwischen Tumor und Stroma

Abbildung 63 Verhältnis Tumor - Stroma: T-Helferzellen

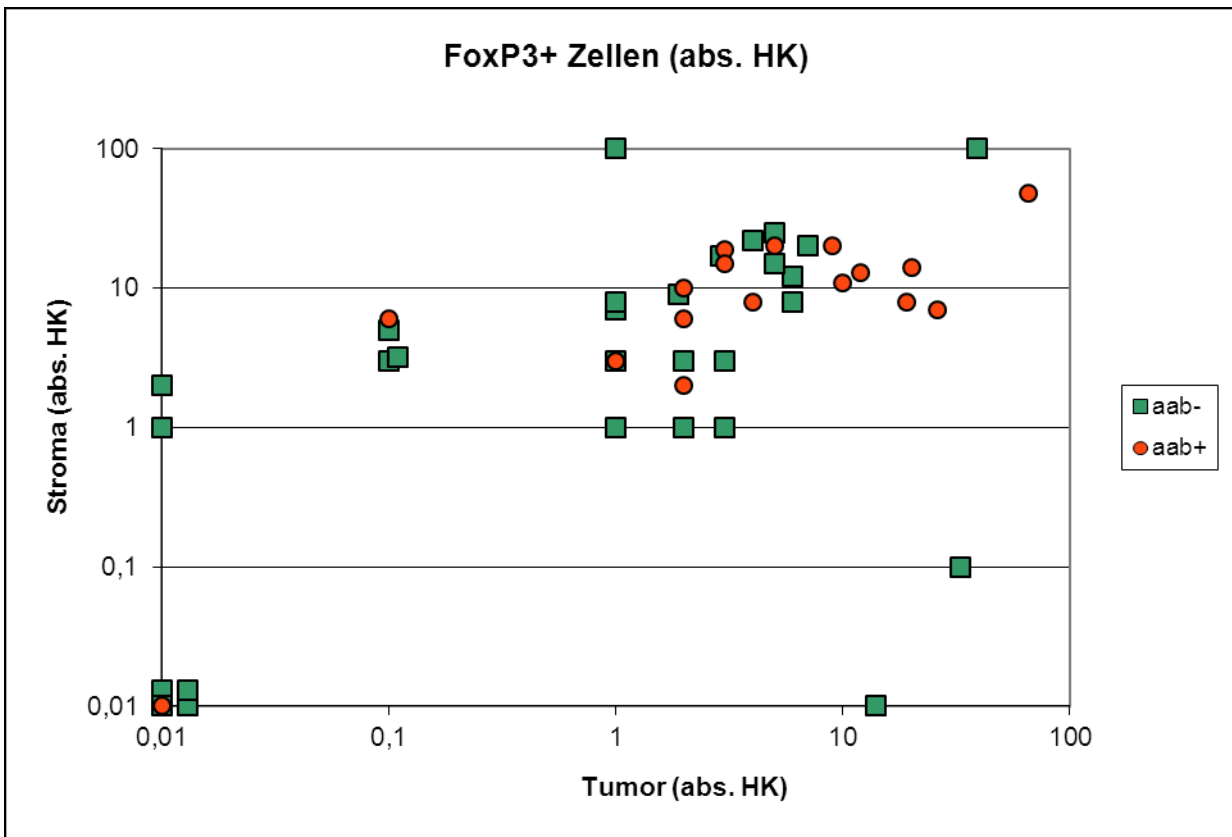


Abbildung 64 Verhältnis Tumor - Stroma: regulatorische T-Zellen

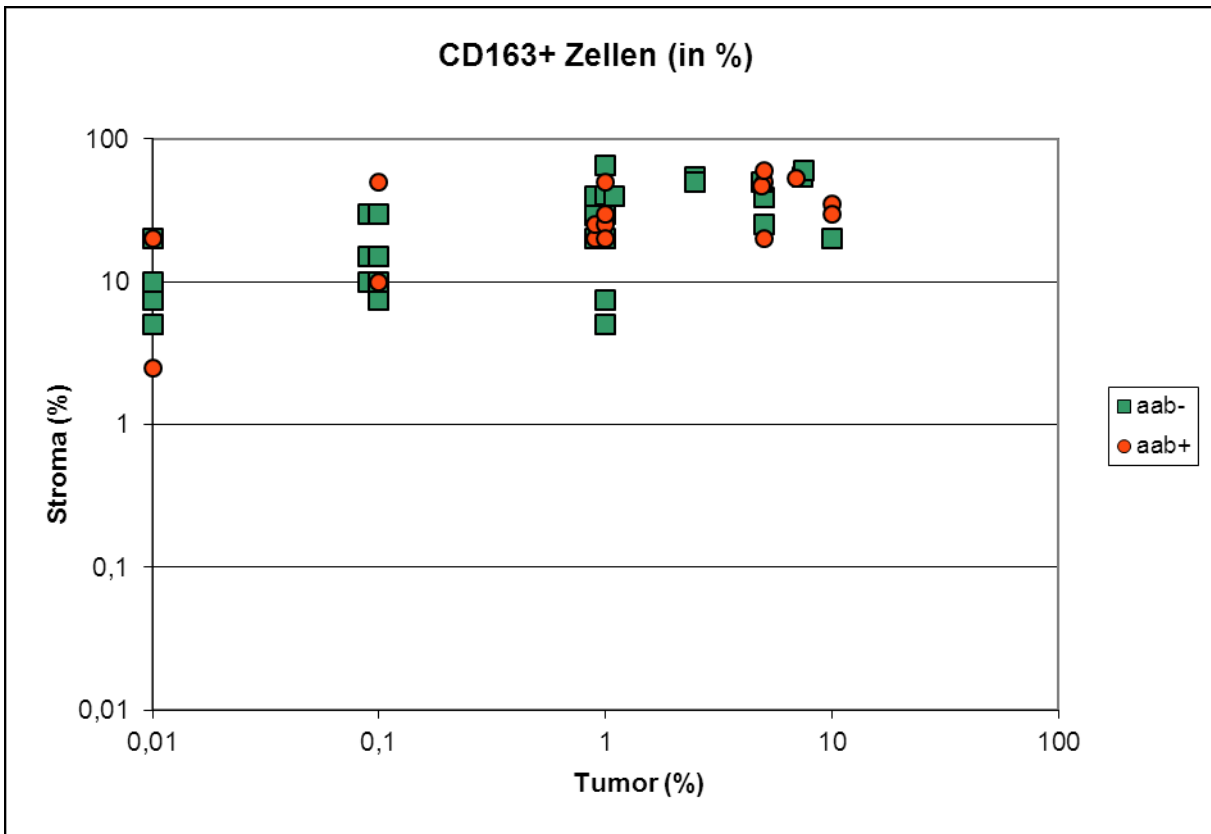


Abbildung 65 Verhältnis Tumor - Stroma: Makrophagen

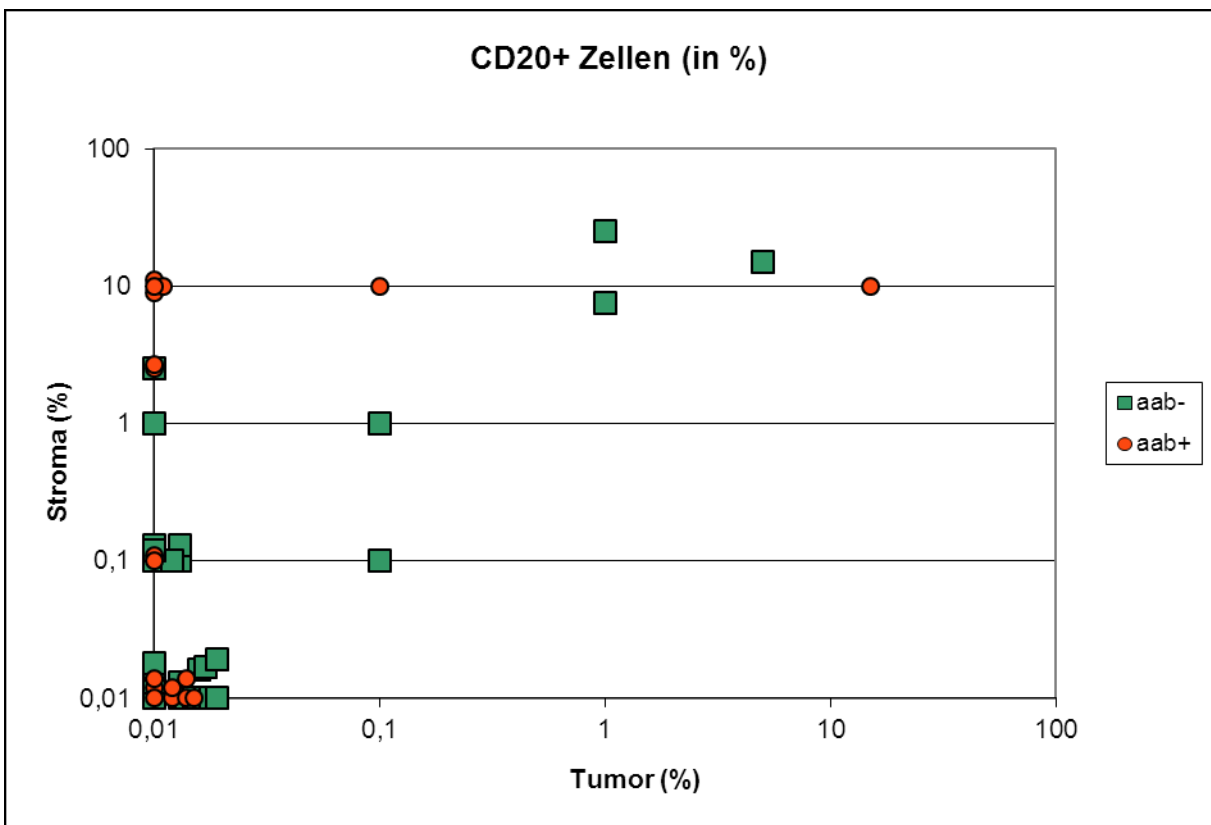


Abbildung 66 Verhältnis Tumor - Stroma: B-Zellen

Sequenzierung

>1_FoxP3-1-1_M13F

GATTGGGCGCAGCTGCGATGGCTCCCGGCCCATGGCCGCGGGATTGGCCAGATGGACATCACCTACCACATCCACCAGCACCCATGTCACCCACCT
 GGGCCAAGCCTGCTGCAGGACAGGGCAGCCAGTTCTCGGAACGAAACCTGTGGGGTGGGGTATCTGCCCTCTTCTCTCCCTCCGTGGTGTGATGAAGC
 CCGGCGCATCCGGCCGCCATGACGTCAATGGCGGAAAAATCTGGGCAAGTCGGGGGCTGTGACAACAGGGGCCAGATGCAGACCCCGATATGAAAC
 ATAATCTGTGTCCAGAAACATCCCCATTAGCTTCTGAGAAACCCAGTCAGAAAGGGACGTCCCAACAGACAGTGCAGGAAGCCGGCTGCCAGCCC
 GGCCCTCTAGGTCTCTACCCCGAGACAGATCATCTCCATGTCCCTGTCTGAGAACTACTAGTCGGCGCCCTGCAGGTGCACCATATGGGAGAGCTCCC
 AACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGCACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCA
 CAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCG
 CTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCCTATTGGGCGCTCTCCGCTTCCTCGC
 TCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCTGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAG
 GAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAGAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCAT
 CAAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAGATACCAGGCGTTTCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTT
 CCGACCCTGCCGTTACCGGANACCTG

→ Insert innerhalb der Plasmid-Sequenz ist gelb hinterlegt.

>2_FoxP3-1-1_M13R

NCTATAGNAATACTCAAGCTATGCATCCAACGCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCACTAGTGATTCTCAGACAGGGACATG
 GAGATGATCTGTCTGGGGTAGAGGACCTAGAGGGCCGGGCTGGGCAGCCGGCTTCTGCACTGTCTGTTGGGACGTCCCTTTCTGACTGGGTTTCTCA
 GAAGCTGAATGGGGATGTTTCTGGGACACAGATTATGTTTTCATATCGGGGTCTGCATCTGGGCCCTGTTGTACAGCCCCGACTTGCCAGATTTTT
 CCGCCATTGACGTGATGGCGGCCGGATGCGCCGGGCTTCATCGACACCACGGAGGAAGAGAAGAGGGCAGATACCCACCCACAGGTTTCTGTTCCGA
 GAACTGGTGCCTGTCTGCGAGCAGGCTTGGCCAGGTGGGGTGACATGGGTGCTGGTGGATGTGGTAGGTGATGTCCATCTGGCCAATCCCGCGGC
 CATGGCGGCCGGGAGCATGCGACGTGGGCCCAATTGCGCCTATAGTGAGTCGATTACAATTAAGTGGCGCTGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAA
 ACCCTGGCGTTACCAACTTAATCGCCTTGCGACACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCAGTCGCCCTTCCCAACAGTT
 GCGCAGCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGCGCATTAAGCGCGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCCTACACTTGCCAGCG
 CCCTAGCGCCCGCTCTTTGCTTTCTTCCCTTCTTCTCGCCAGTTTCGCCGGCTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGTTCCGATT
 TAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTGACGTTG
 GAGTCCACGTTCTTTAATAGTGACTCTTGTTCCAACTGGAACAACACTCAACCTATCTCGGTCTATTCTTTGATTATAAGGGATTTTGCCGATTTGCG
 GCCTATTGGTTAAAAAATGNNCTGATTTAACAAAAATTTAACSCGAATTTTAACAAAWWTTAACSCCT

→ BLAST: keine Unterschiede zur Datenbanksequenz in F+R

1_FoxP3-1-1_M13F

Length: 1116

Range 1: 48 to 449

| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand |
|----------------|--|----------------|------------|-----------|
| 743 bits (402) | 0.0 | 402/402 (100%) | 0/402 (0%) | Plus/Plus |
| Query 1 | GGCCAGATGGACATCACCTACCACATCCACCAGCACCCATGTCACCCACCTGGGCCAAG | 60 | | |
| Sbjct 48 | GGCCAGATGGACATCACCTACCACATCCACCAGCACCCATGTCACCCACCTGGGCCAAG | 107 | | |
| Query 61 | CCTGCTGCAGGACAGGGCAGCCAGTTCTCGGAACGAAACCTGTGGGGTGGGGTATCTGCC | 120 | | |
| Sbjct 108 | CCTGCTGCAGGACAGGGCAGCCAGTTCTCGGAACGAAACCTGTGGGGTGGGGTATCTGCC | 167 | | |
| Query 121 | CTCTTCTCTTCCCTCCGTGGTGTGATGAAGCCCGGCGCATCCGGCCGCCATGACGTCAAT | 180 | | |
| Sbjct 168 | CTCTTCTCTTCCCTCCGTGGTGTGATGAAGCCCGGCGCATCCGGCCGCCATGACGTCAAT | 227 | | |
| Query 181 | GGCGGAAAAATCTGGGCAAGTCGGGGGCTGTGACAACAGGGGCCAGATGCAGACCCCGAT | 240 | | |
| Sbjct 228 | GGCGGAAAAATCTGGGCAAGTCGGGGGCTGTGACAACAGGGGCCAGATGCAGACCCCGAT | 287 | | |
| Query 241 | ATGAAAACATAATCTGTGTCCAGAAACATCCCCATTAGCTTCTGAGAAACCCAGTCA | 300 | | |
| Sbjct 288 | ATGAAAACATAATCTGTGTCCAGAAACATCCCCATTAGCTTCTGAGAAACCCAGTCA | 347 | | |
| Query 301 | GAAAGGGACGTCCCAACAGACAGTGCAGGAAGCCGGCTGCCAGCCCGGCCCTCTAGGTC | 360 | | |
| Sbjct 348 | GAAAGGGACGTCCCAACAGACAGTGCAGGAAGCCGGCTGCCAGCCCGGCCCTCTAGGTC | 407 | | |
| Query 361 | CTCTACCCCGACAGATCATCTCCATGTCCCTGTCTGAGAA | 402 | | |
| Sbjct 408 | CTCTACCCCGACAGATCATCTCCATGTCCCTGTCTGAGAA | 449 | | |

>3_FoxP3-2-1_M13F

GATTGGGCGGACGTCGCATGCTCCCGGCCCATGGCCGCGGGATTGGCCAGATGGACATCACCTACCACATCCACCAGCACCCATGTCACCCACCTG
GGCCAAGCCTGCTGCAGGACAGGGCAGCTAGTTCTCGGAACGAAACCTGTGGGGTGGGGTATCTGCCCTCTTCTTCTCCTCGTGGTGTGCGATGAAGCC
CGGCGCATCCGGCCGCATGACGTCAATGGCGGAAAAATCTGGGCAAGTCGGGGGCTGTGACAACAGGGCCAGATGCAGACCCCGATATGAAAAACA
TAATCTGTGTCCAGAAAAACATCCCCATTAGCTTCTGAGAAACCCAGTCAGAAAGGGGACGTCCCAACAGACAGTGCAGGAAGCCGCTGCCAGCCCCG
GCCCTTAGGTCTCTACCCCCAGACAGATCATCTCCATGTCCCTGTCTGAGAAATCACTAGTGCAGGCCGCTGCAGGTGCACCATATGGGAGAGCTCCC
AACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCA
CAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCG
CTTTCAGTCGGGAAACCTGTGCTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTTCGTATTGGGCGCTCTCCGCTTCTCGC
TCACTGACTCGTGTGCTCGGTCTGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCAAAAGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAG
GAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGTGCGTTTTTCCATAGGTCGCCCCCCCTGACGAGCAT
CACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTYTCTGTTC
CGACCTGCGCCTTACCGGAWACCTG

➔ Insert innerhalb der Plasmid-Sequenz ist gelb hinterlegt. Die veränderte Base ist in rot dargestellt.

>4_FoxP3-2-1_M13R

GTGACTATAGAATACTCAAGCTATGCATCCAACGCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCACTAGTGATTTCTCAGACAGGGAC
ATGGAGATGATCTGTCTGGGGGTAGAGGACCTAGAGGGCCGGGCTGGGCAGCCGGCTTCTGCACTGTCTGTTGGGACGTCCCTTTCTGACTGGGTTTC
TCAGAAAGCTGAATGGGGGATGTTTCTGGGACACAGATTATGTTTTCATATCGGGGTCTGCATCTGGGCCCTGTTGTACAGCCCCGACTTGCCAGATT
TTTCCGCCATTGACGTATGGCGGCCGATGCGCCGGGCTTCATGCACACCACGAGGAAGAGAAGAGGGCAGATACCCACCCACAGGTTTCCGTTCC
GAGAAGCTAGTCCCTGTCTGCGCAGGCTTGGCCAGGTGGGGTGACATGGGTGCTGGTGGATGTGGTAGGTGATGTCATCTGGCCAATCCCGCG
GCCATGGCGGCCGGGAGCATGCGACGTGCGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGATTACAATCACTGGCCGCTGTTTTACAACGTCGTGACTGGGA
AAACCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGACCGATCGCCCTTCCAACAG
TTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAGCGCGCGGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGC
GCCCTAGCGCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCTTTCGCCAGCTTCCCGGCTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGA
TTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAAAATTGATTAGGGTGATGGTTACGTAAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTT
GGANTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTCCAAACTGGAACAACACTCAACCTATCTCGGTCTATTCTTTGATTATAAGGGATTTTGCCGATTNC
GGCCTATTGGTTAAAAAATGNNNTGATTTAACAAAAATTAACNNCGAATTTTA

3_FoxP3-2-1_M13F

Length: 1116

Range 1: 47 to 448

| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand |
|----------------|--------|---------------|------------|-----------|
| 737 bits (399) | 0.0 | 401/402 (99%) | 0/402 (0%) | Plus/Plus |

| | | | |
|-------|-----|---|-----|
| Query | 1 | GGCCAGATGGACATCACCTACCACATCCACCAGCACCCATGTCACCCACCTGGGCAAG | 60 |
| | | | |
| Sbjct | 47 | GGCCAGATGGACATCACCTACCACATCCACCAGCACCCATGTCACCCACCTGGGCAAG | 106 |
| Query | 61 | CCTGCTGCAGGACAGGGCAGCAGTTCTCGGAACGAAACCTGTGGGGTGGGGTATCTGCC | 120 |
| | | | |
| Sbjct | 107 | CCTGCTGCAGGACAGGGCAGCTAGTTCTCGGAACGAAACCTGTGGGGTGGGGTATCTGCC | 166 |
| Query | 121 | CTCTTCTCTTCTCCTCCGTGGTGTGCGATGAAGCCCGGCGCATCCGGCCGCCATGACGTCAAT | 180 |
| | | | |
| Sbjct | 167 | CTCTTCTCTTCTCCTCCGTGGTGTGCGATGAAGCCCGGCGCATCCGGCCGCCATGACGTCAAT | 226 |
| Query | 181 | GGCGGAAAAATCTGGGCAAGTCGGGGGCTGTGACAACAGGGCCAGATGCAGACCCCGAT | 240 |
| | | | |
| Sbjct | 227 | GGCGGAAAAATCTGGGCAAGTCGGGGGCTGTGACAACAGGGCCAGATGCAGACCCCGAT | 286 |
| Query | 241 | ATGAAAACATAATCTGTGTCCAGAAACATCCCCATTAGCTTCTGAGAAACCCAGTCA | 300 |
| | | | |
| Sbjct | 287 | ATGAAAACATAATCTGTGTCCAGAAACATCCCCATTAGCTTCTGAGAAACCCAGTCA | 346 |
| Query | 301 | GAAAGGGACGTCCCAACAGACAGTGCAGGAAGCCGGCTGCCAGCCCGGCCCTCTAGGTC | 360 |
| | | | |
| Sbjct | 347 | GAAAGGGACGTCCCAACAGACAGTGCAGGAAGCCGGCTGCCAGCCCGGCCCTCTAGGTC | 406 |
| Query | 361 | CTCTACCCCCAGACAGATCATCTCCATGTCCCTGTCTGAGAA | 402 |
| | | | |
| Sbjct | 407 | CTCTACCCCCAGACAGATCATCTCCATGTCCCTGTCTGAGAA | 44 |

➔ Austausch C=>T an Position 82 (gelb markiert)

Etablierung der Methylierungsanalyse

Austesten verschiedener Annealing-Temperaturen

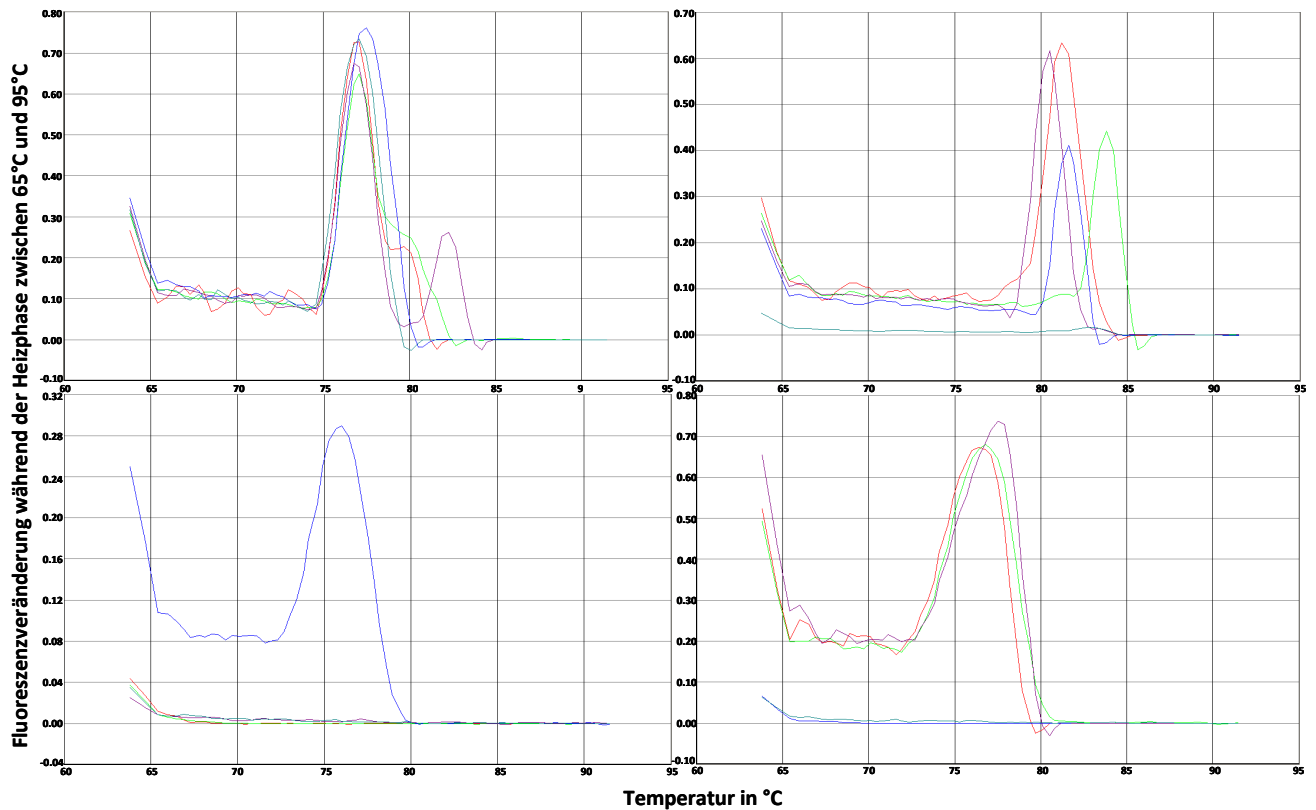


Abbildung 67 Schmelzkurve Gradienten-PCR (M-PCR):

58,1 °C (rot), 60,2 °C (grün), 62,4 °C (dunkelblau), 64,5 °C (lila), 66,1 °C (hellblau)

links oben: K6, rechts oben: Plasmid FoxP3 1-1, links unten: HaCaT, rechts unten: aqua dest.

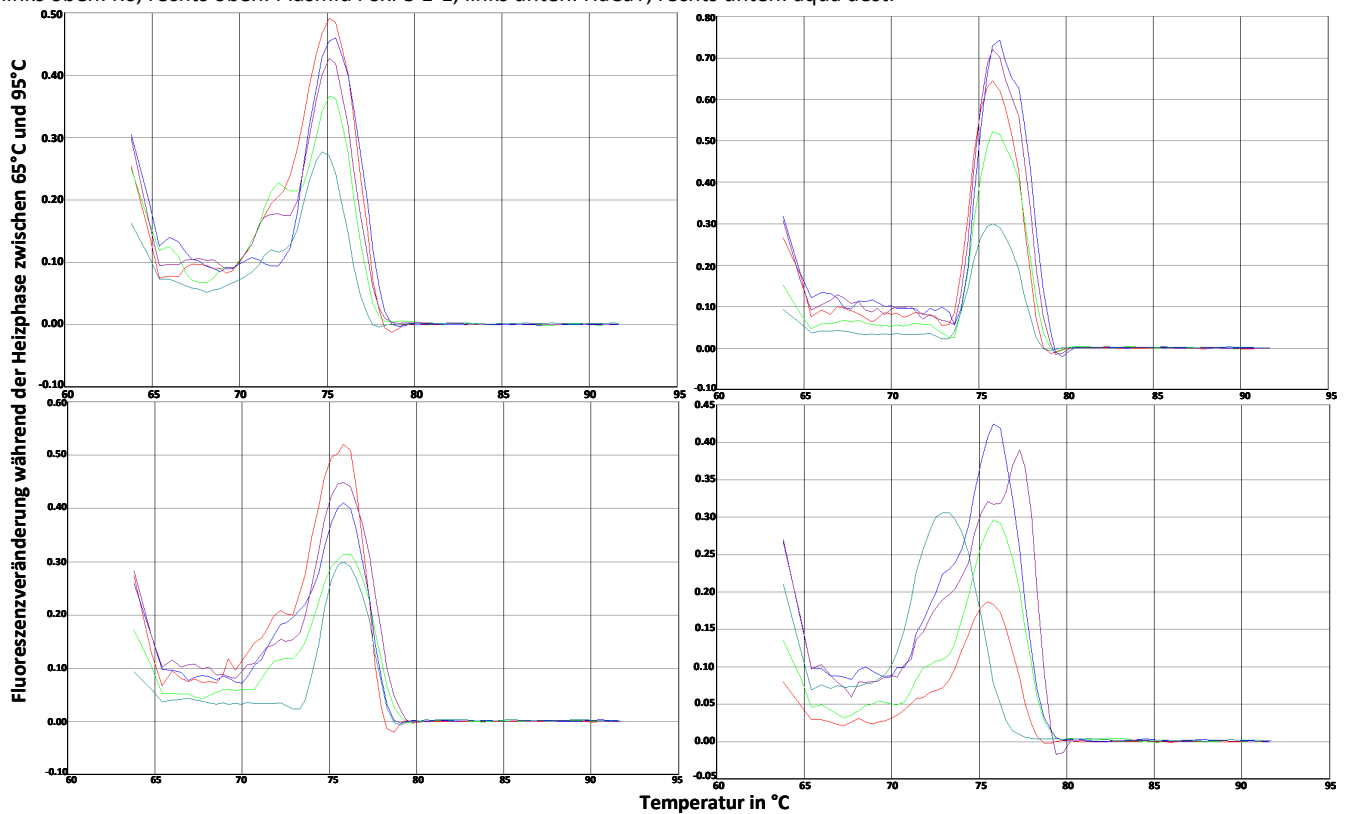


Abbildung 68 Schmelzkurve Gradienten-PCR (NM-PCR):

58,1 °C (rot); 60,2 °C (grün); 62,4 °C (dunkelblau); 64,5 °C (lila); 66,1 °C (hellblau)

links oben: K6, rechts oben: Plasmid FoxP3 1-1, links unten: HPK II, rechts unten: aqua dest.

Austesten verschiedener Primer-Konzentrationen

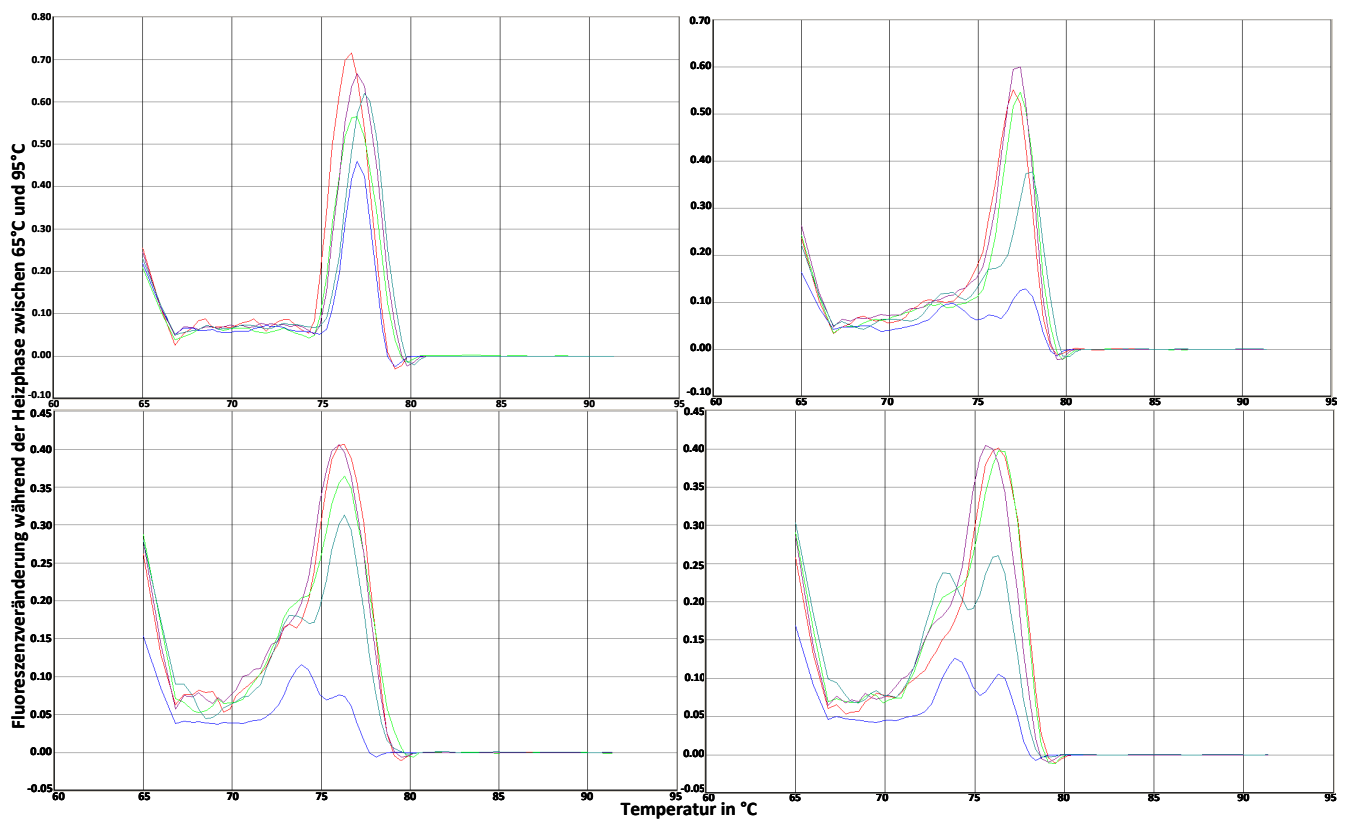


Abbildung 69 Schmelzkurve Primer-Konzentrationen (NM-qPCR):

5 pmol/μL rot; 3,75 pmol/μL lila; 2,5 pmol/μL grün; 1,25 pmol/μL hellblau; 0,625 μL dunkelblau

links oben: Verdünnung III, rechts oben: Verdünnung IV, links unten: Verdünnung V, rechts unten: aqua dest.

Methylierungsanalyse der klinischen Proben

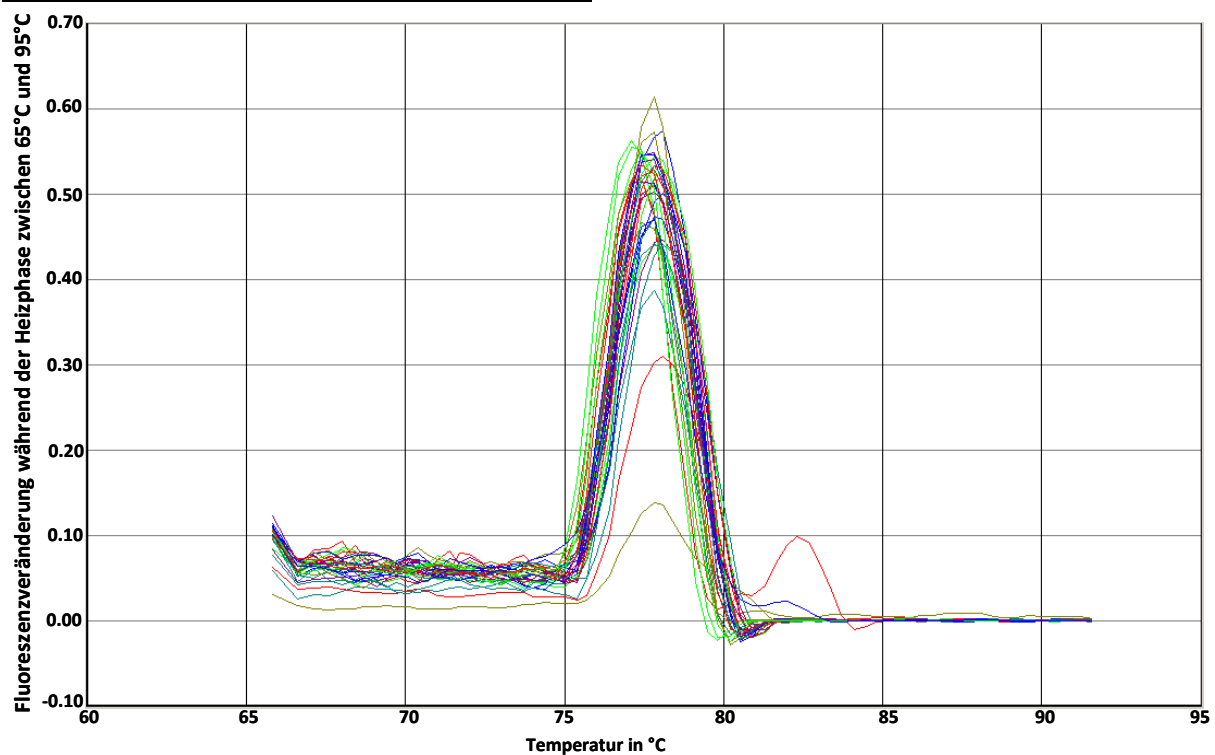


Abbildung 70 Schmelzkurve: M-qPCR (klinische Proben)

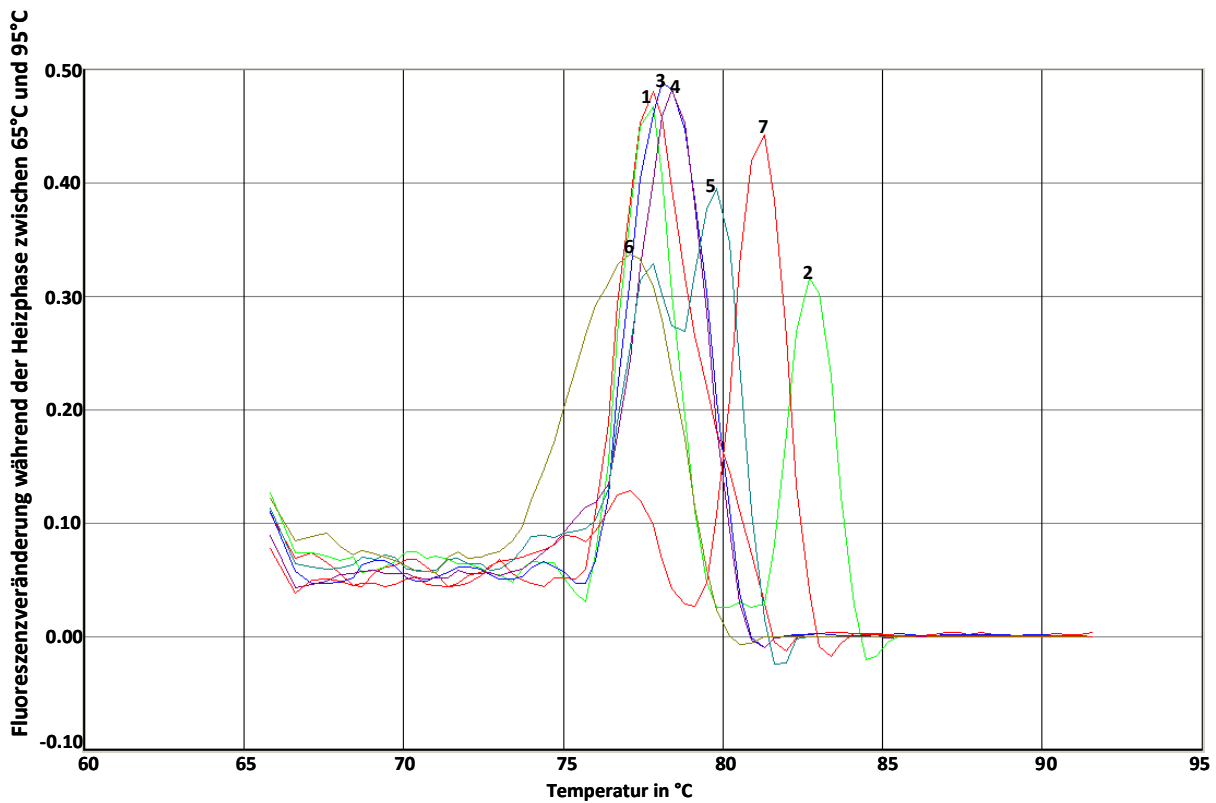


Abbildung 71 Schmelzkurve: M-qPCR (Verdünnungsreihe u. Wasserkontrolle)

100 % Methylierung (1); 99 % Methylierung (2); 90 % Methylierung (3); 10 % Methylierung (4); 1 % Methylierung (5); 0 % Methylierung (6); aqua dest. (7)

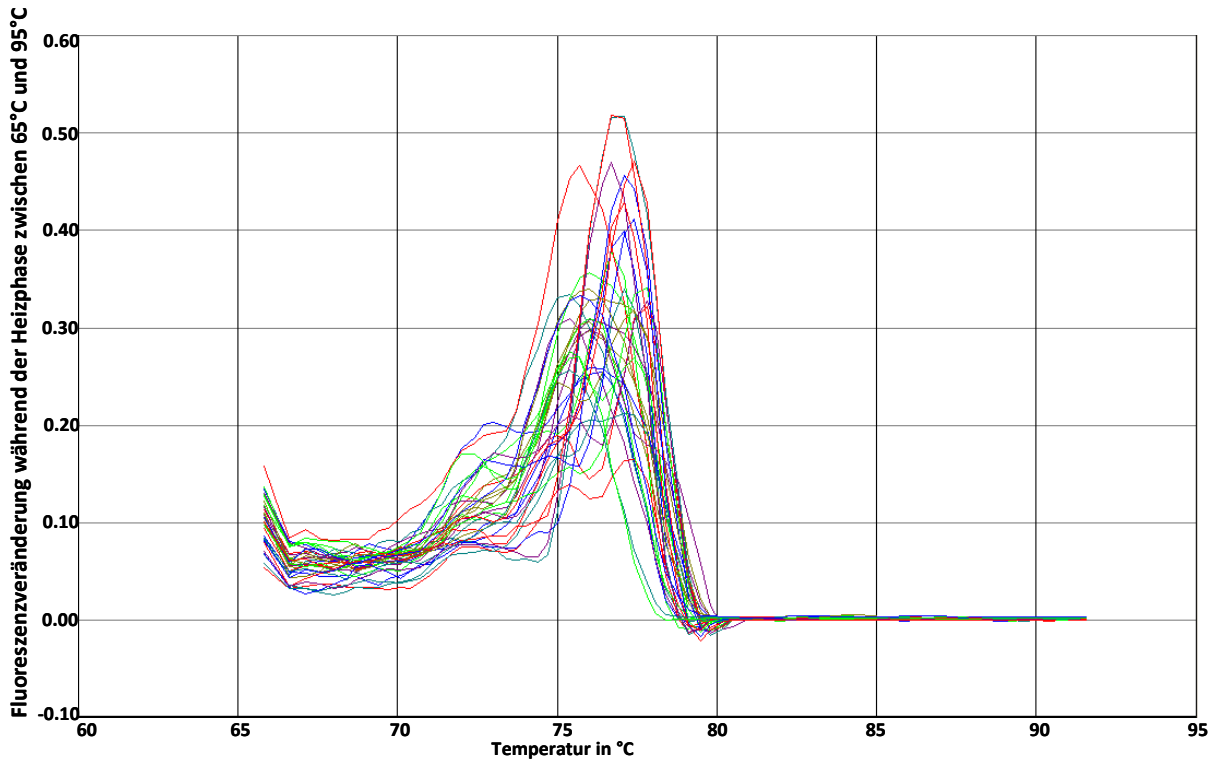


Abbildung 72 Schmelzkurve: NM-qPCR (klinische Proben)

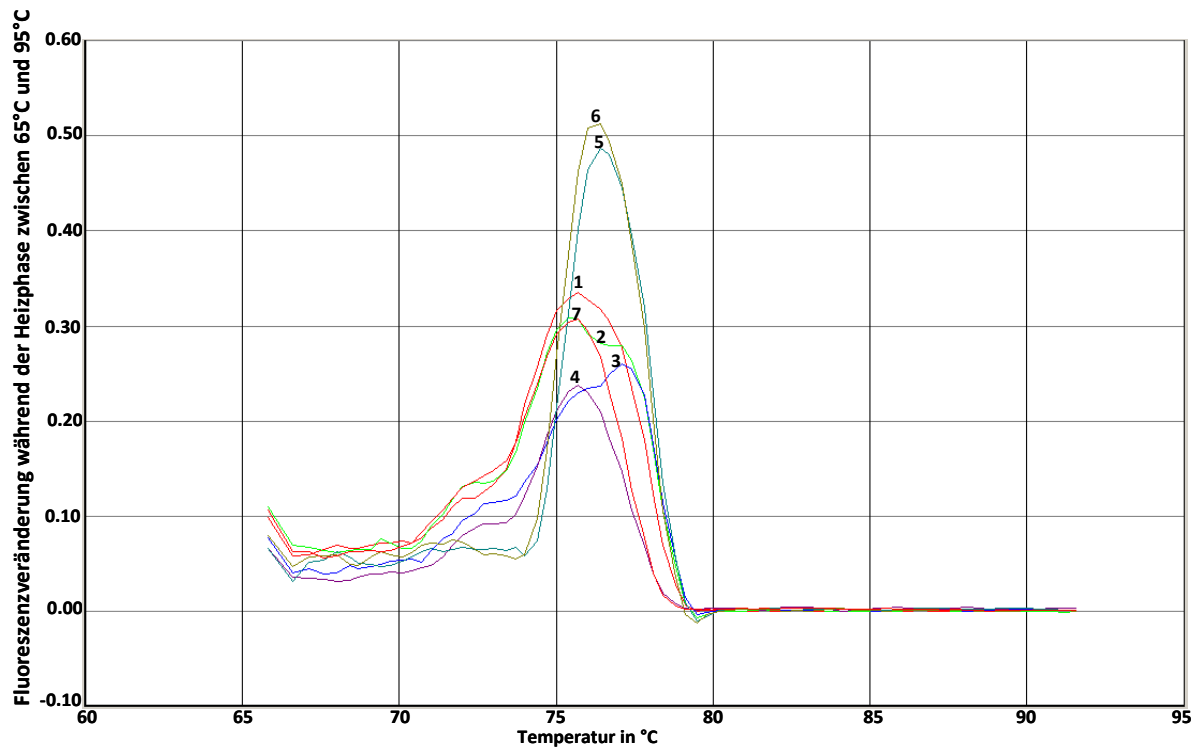


Abbildung 73 Schmelzkurve: NM-qRT-PCR (Verdünnungsreihe u. Wasserkontrolle)

100 % Methylierung (1); 99 % Methylierung (2); 90 % Methylierung (3); 10 % Methylierung (4); 1 % Methylierung (5); 0 % Methylierung (6); aqua dest. (7)

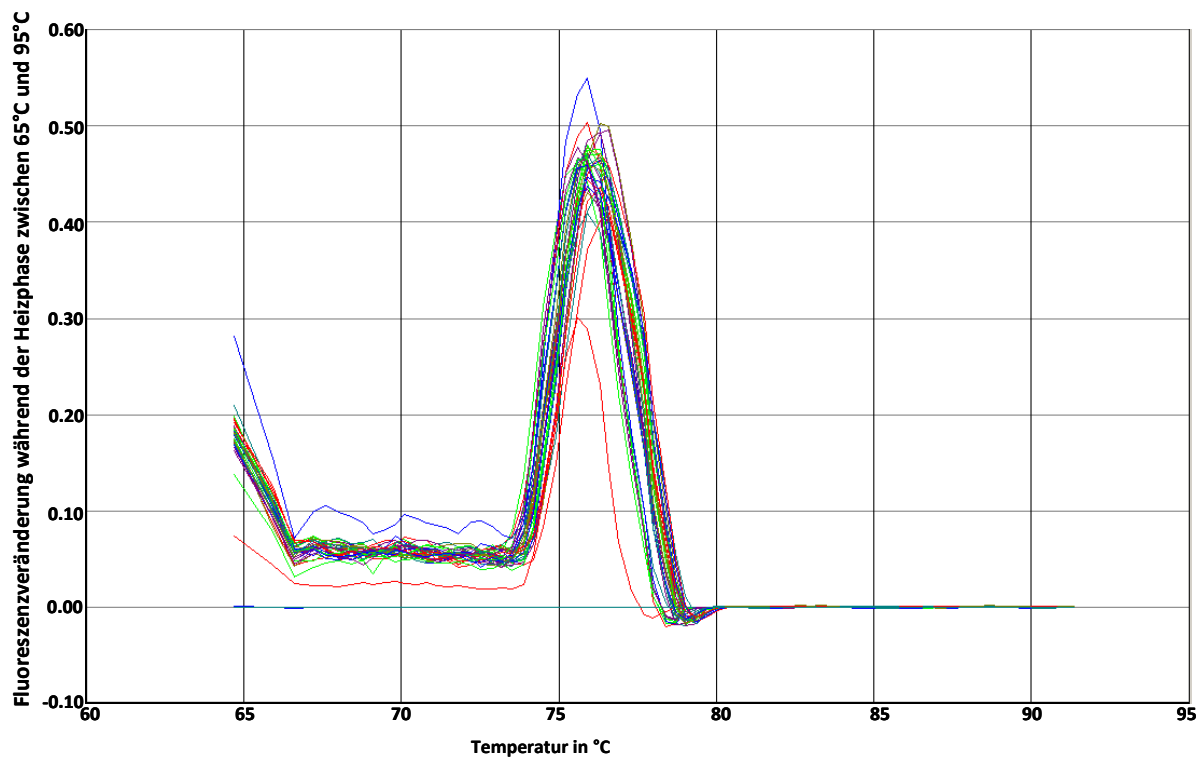


Abbildung 74 Schmelzkurve: Beta-Aktin qPCR (gesamtes Probenset: klinische Proben, Verdünnungsreihe u. Wasserkontrolle)

CD8-Primer

Amplifikation des CD8-Beta-Genabschnitts: Exon 1-3 (passend auf alle Spleißvarianten, alle <1500bp)

GCGACTGTCTCCGCCGAGCCCCGGGGCCAGGTGTCCCGGGCGCGCCACGATGCGGCCGC
GGCTGTGGCTCCTCTTGCCGCGCAGCTGACAG

TTCTCCATGGCAACTCAGTCCTCCAGCAGACCCCTGCATACATAAAGGTGCAAACCAACA
AGATGGTGATGCTGTCCTGCGAGGCTAAAATCTCCCTCAGTAACATGCGCATCTACTGGC
TGAGACAGCGCCAGGCACCGAGCAGTGACAGTCACCACGAGTTCCTGGCCCTCTGGGATT
CCGAAAAGGGACTATCCACGGTGAAGAGGTGGAACAGGAGAAGATAGCTGTGTTTCGGG
ATGCAAGCCGGTTCATTCTCAATCTCACAAGCGTGAAGCCGGAAGACAGTGGCATCTACT
TCTGCATGATCGTCGGGAGCCCCGAGCTGACCTTCGGGAAGGGAAGTCAAGTGTGG

TTGATTTCTTCCACCACTGCCAGCCCACCAAGAAGTCCACCCTCAAGAAGAGAGTGT
GCCGGTTACCCAGGCCAGAGACCCAGAAGG

Name: CD8b qRT-PCR.txt-79F
Sequence: GCGGCTGTGGCTCCTCT
Name: CD8b qRT-PCR.txt-179R
Sequence: CCATCTTGTGTGGTTTGCACCTT

Name: CD8b qRT-PCR.txt-430F => im BLAST besser
Sequence: GAGCCCCGAGCTGACCTT
Name: CD8b qRT-PCR.txt-538R
Sequence: CCGGCACACTCTCTTCTTGAG

Etablierung der Genexpressionsanalyse

Austesten unterschiedlicher Annealing-Temperaturen – Gradienten-PCR

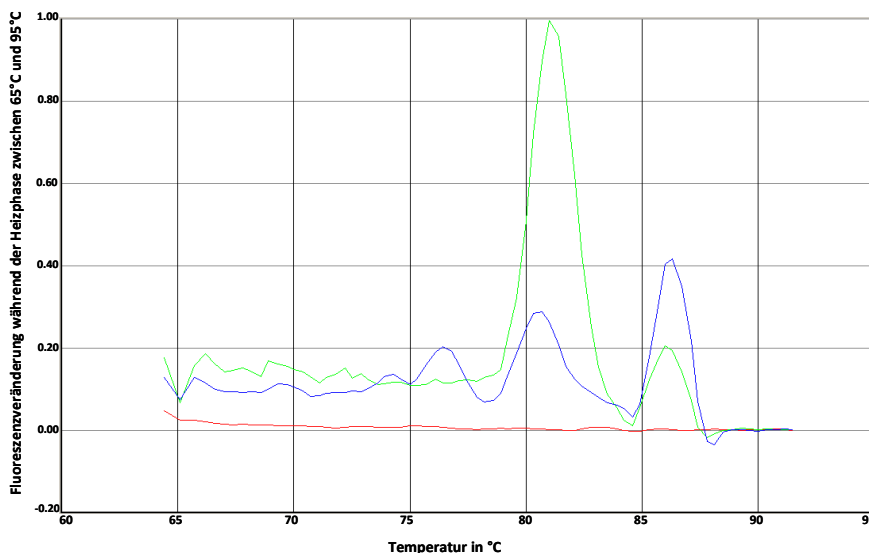


Abbildung 75 Schmelzkurve Annealing-Temperatur 58°C: aqua dest. (rot), A2780 (blau), klinische Probe 8265 (grün)

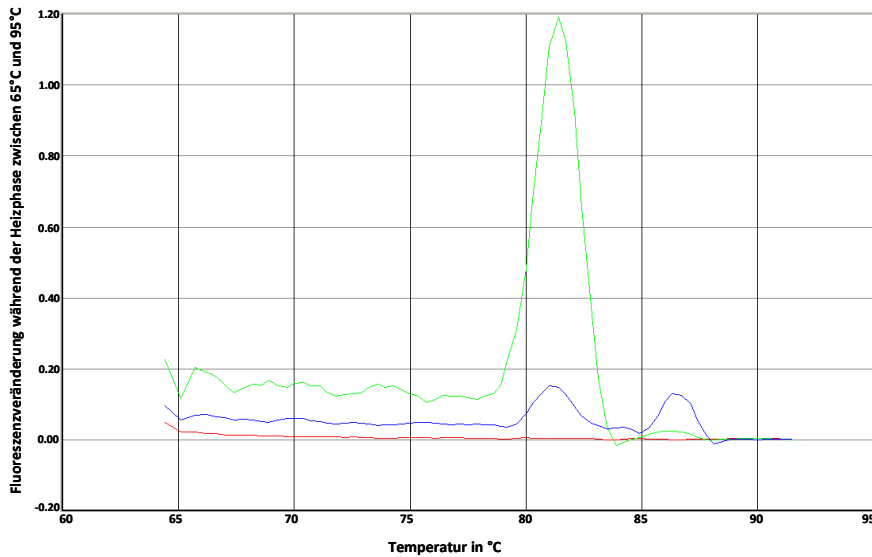


Abbildung 76 Schmelzkurve Annealing-Temperatur 60°C: aqua dest. (rot), A2780 (blau), klinische Probe 8265 (grün)

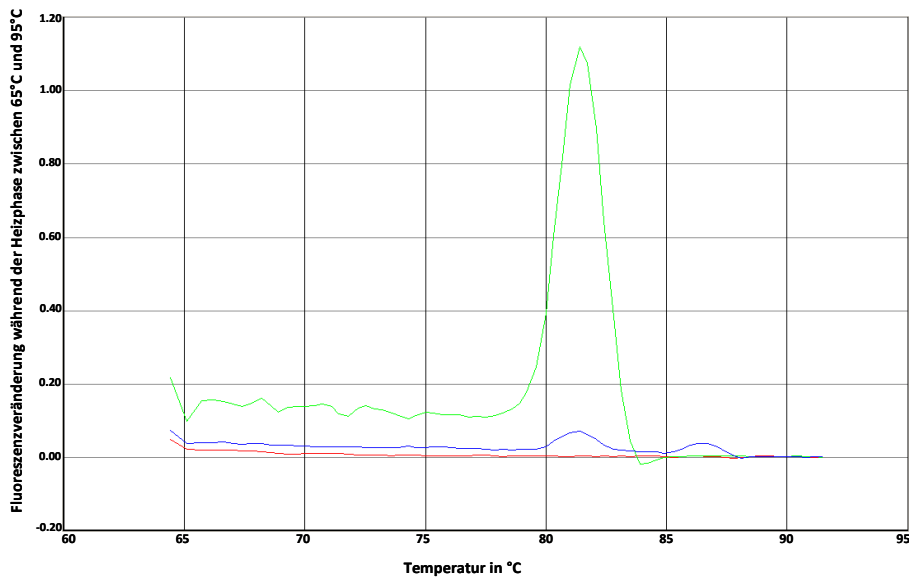


Abbildung 77 Schmelzkurve Annealing-Temperatur 62°C: aqua dest. (rot), A2780 (blau), klinische Probe 8265 (grün)

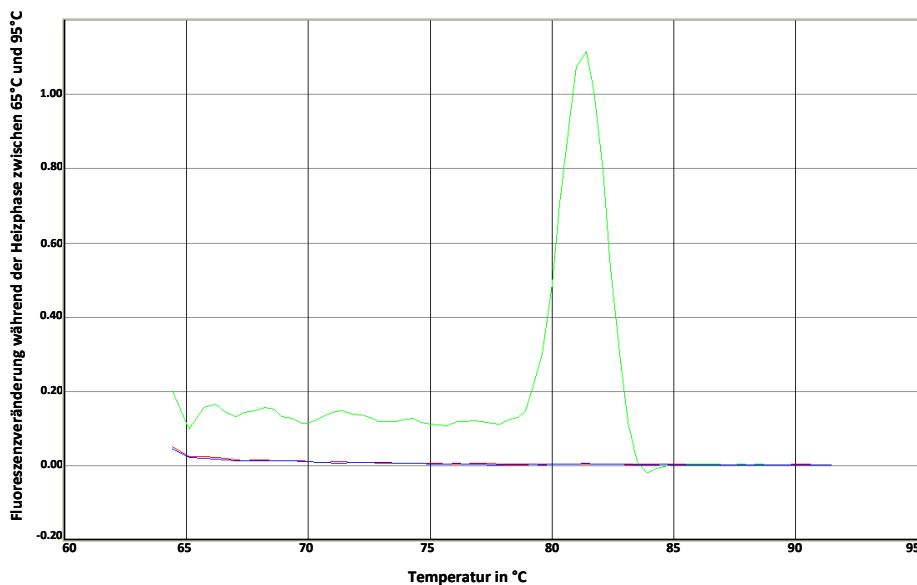


Abbildung 78 Schmelzkurve Annealing-Temperatur 63,5°C: aqua dest. (rot), A2780 (blau), klinische Probe 8265 (grün)

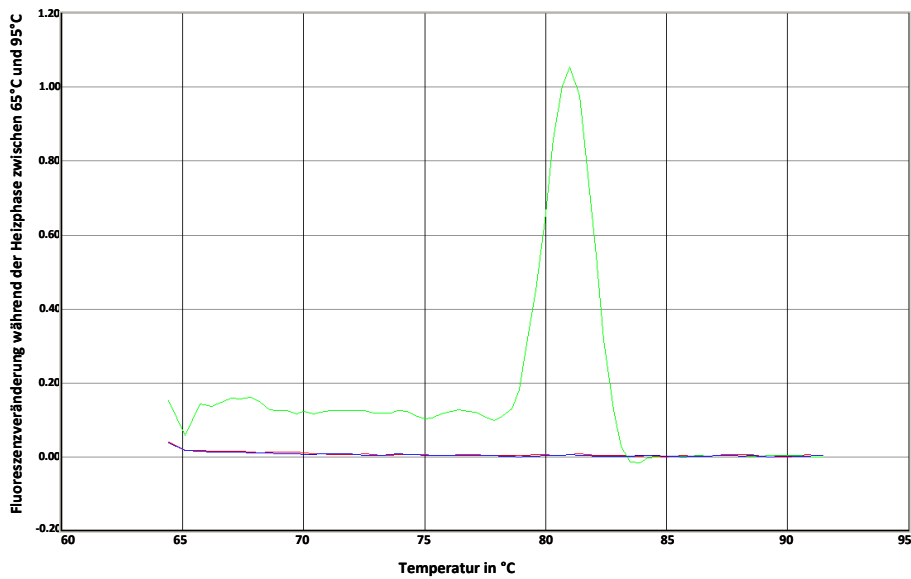


Abbildung 79 Schmelzkurve Annealing-Temperatur 65,4°C: aqua dest. (rot), A2780 (blau), klinische Probe 8265 (grün)

Auswertung Genexpressionsdaten Korrelation mit IHC-Daten

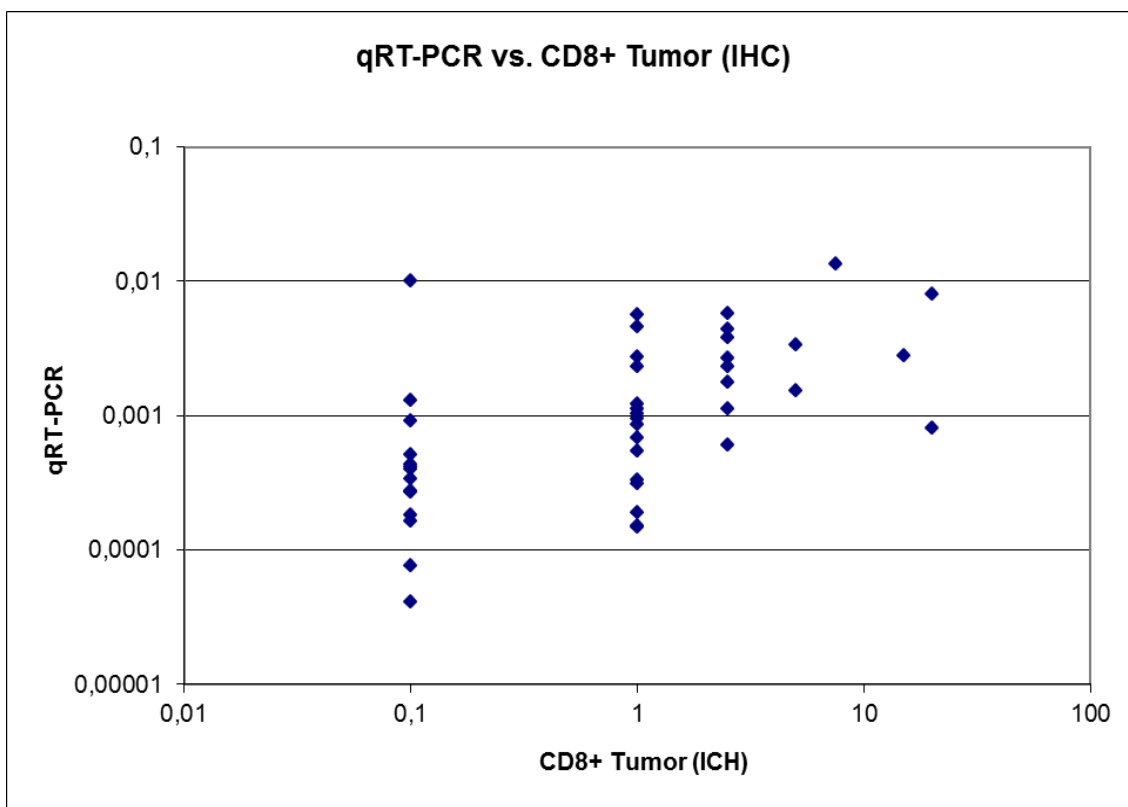


Abbildung 80 Genexpressionsdaten in Abhängigkeit von den IHC-Daten (CD8+ Zellen im Tumorbereich)

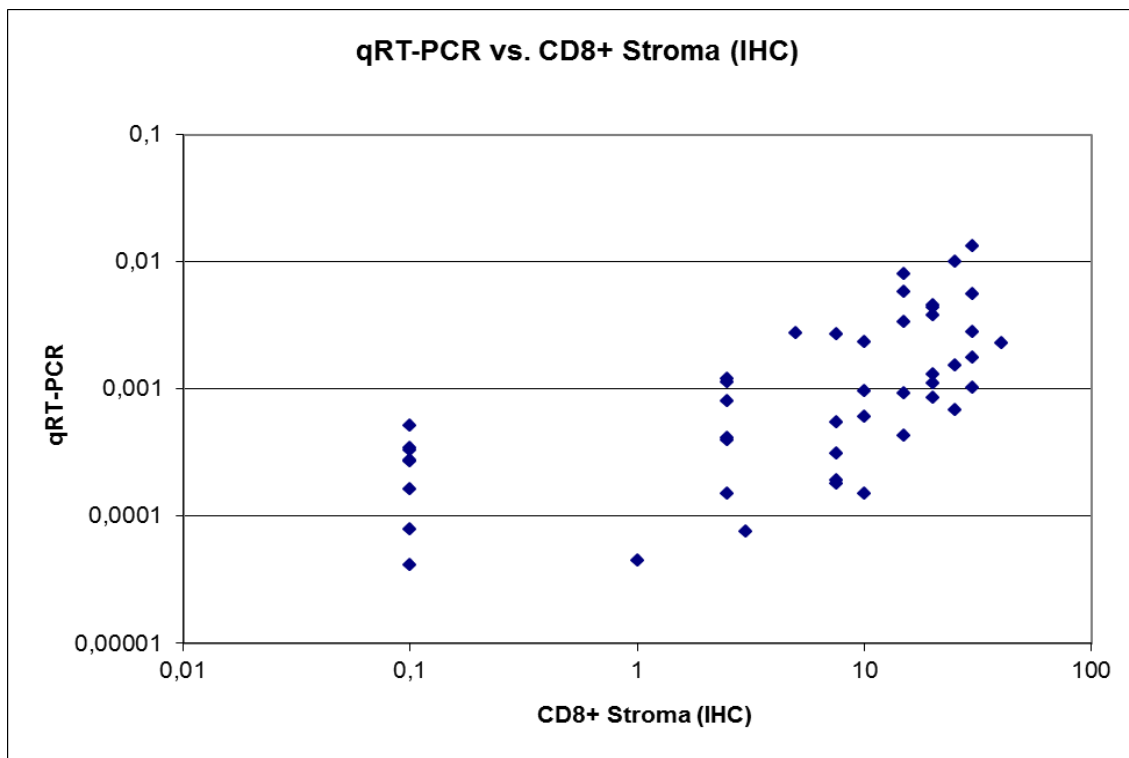


Abbildung 81 Genexpressionsdaten in Abhängigkeit von den IHC-Daten (CD8+ Zellen im Stromabereich)

Daten aus der immunhistochemischen Färbung an den klinischen Gewebe-Proben (gesamtes Färbungsset)**Tabelle 60 Immunhistochemie-Daten: gesamtes Färbungsset (klinische Proben)****→ 0=keine Färbung; Immunzell-Infiltrate (IF): 0=IF-negativ, 1=IF-positiv**

| TB-Nr. | | CD4 (in %) | | CD8 (in %) | | FoxP3 (abs. HK) | | CD20 (in %) | | CD163 (in %) | | Immunzell-infiltrate | Bemerkungen |
|-------------|------------|------------|--------|------------|--------|-----------------|--------|-------------|--------|--------------|--------|----------------------|-------------|
| | | Tumor | Stroma | Tumor | Stroma | Tumor | Stroma | Tumor | Stroma | Tumor | Stroma | | |
| 23 | T1a | 40 | 10 | 20 | 2,5 | 33 | 0,1 | 5 | 15 | 10 | 20 | 1 | |
| 195 | Ta | 2,5 | 65 | 0,1 | 15 | 0,1 | 3 | 0 | 0,1 | 1 | 40 | 1 | |
| 329 | Ta | 1 | 30 | 2,5 | 7,5 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 20 | 0 | |
| 405 | T | 7,5 | 80 | 2,5 | 40 | 1 | 100 | 1 | 7,5 | 1 | 40 | 1 | |
| 433 | T1 | 15 | 50 | 2,5 | 10 | 3 | 1 | 0 | 0,1 | 5 | 40 | 1 | |
| 668 | Ta | 10 | 35 | 1 | 10 | 2 | 10 | 0 | 0 | 1 | 20 | 1 | |
| 793 | Ta | 7,5 | 50 | 1 | 5 | 0,1 | 5 | 0 | 0 | 1 | 20 | 1 | |
| 976 | T1a | 5 | 45 | 2,5 | 20 | 0,1 | 6 | 0 | 0 | 1 | 25 | 1 | |
| 1477 | T1 | 2,5 | 60 | 1 | 25 | 10 | 11 | 0 | 0 | 5 | 50 | 1 | |
| 1547 | T | 5 | 25 | 0,1 | 0,1 | 0 | 1 | | | 0 | 7,5 | 0 | |
| 1751 | T1 | | | | | | | | | | | | |
| 1845 | T1a | 1 | 15 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 20 | 0 | |
| 2011 | T1 | 2,5 | 85 | 0,1 | 3 | 0,1 | 3 | 0 | 0 | 0,1 | 7,5 | 1 | |
| 2025 | T1a | 5 | 70 | 1 | 0,1 | 19 | 8 | 0 | 0 | 0,1 | 50 | 1 | |
| 2127 | T1a | 25 | 60 | 1 | 20 | 20 | 14 | 0 | 0,1 | 7,5 | 55 | 1 | |

| | | | | | | | | | | | | | |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|-----|-----|---|-----------------------------------|
| 2340 | T1a | 30 | 80 | 15 | 30 | 39 | 100 | 1 | 25 | 7,5 | 55 | 1 | |
| 2473 | Ta | 2,5 | 20 | 0,1 | 0,1 | 2 | 3 | 0 | 0,1 | 0,1 | 15 | 1 | |
| 2483 | T1a | 1 | 20 | 2,5 | 15 | 1 | 7 | 0 | 0 | 0,1 | 15 | 1 | |
| 2564 | Ta | 7,5 | 80 | 1 | 10 | 1 | 8 | 0,1 | 0,1 | 1 | 65 | 1 | |
| 2854 | T1a | 10 | 60 | 2,5 | 30 | 5 | 25 | 0 | 1 | 2,5 | 50 | 1 | |
| 2877 | T1a | 1 | 70 | 2,5 | 20 | 3 | 19 | 0 | 0,1 | 1 | 50 | 1 | |
| 3026 | T1a | 1 | 15 | 0,1 | 0,1 | 1 | 1 | 0 | 0,1 | 0 | 5 | 0 | |
| 3039 | T1 | 2,5 | 60 | 0,1 | 15 | 1 | 3 | 0 | 0 | 5 | 50 | 1 | |
| 3094 | T1 | 1 | 10 | 0,1 | 0,1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 5 | 1 | |
| 3385 | T1 | 5 | 35 | 0,1 | 0,1 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0,1 | 10 | 1 | |
| 3411 | T1 | 5 | 30 | 1 | 2,5 | 2 | 9 | 0 | 0 | 1 | 30 | 0 | |
| 3571 | T1 | 60 | 80 | 20 | 15 | 66 | 48 | 15 | 10 | 10 | 35 | 1 | |
| 4574 | T1a | 0,1 | 10 | 0,1 | 2,5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 1 | |
| 4801 | Ta | 10 | 70 | 5 | 25 | 14 | | 0,1 | 1 | 7,5 | 60 | 1 | keine deutlichen Stroma-Areale |
| 5004 | Ta | 1 | 40 | 0,1 | 25 | 3 | 17 | 0 | 2,5 | 1 | 30 | 1 | |
| 5214 | Ta | | | | | | | | | | | | |
| 5228 | Ta | 2,5 | 60 | 1 | 30 | 4 | 22 | 0 | 0,1 | 2,5 | 50 | 1 | |
| 5239 | T | 0 | 2,5 | 0,1 | 0,1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2,5 | 0 | |
| 5276 | T | 0,1 | 60 | 0 | 0,1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,1 | 30 | 0 | |

| | | | | | | | | | | | | | |
|------|-----|-----|----|-----|-----|----|----|-----|-----|-----|-----|---|--------------------------------|
| 5342 | Ta | 7,5 | 60 | 1 | 7,5 | 5 | 20 | 0 | 0 | 1 | 25 | 1 | |
| 5552 | T1a | | | | | | | | | | | | |
| 6153 | Ta | 5 | 60 | 1 | 7,5 | 6 | 8 | 0 | 0 | 0,1 | 30 | 1 | |
| 6602 | T1a | 2,5 | 60 | 0,1 | 20 | 7 | 20 | 0 | 10 | 1 | 7,5 | 1 | Färbung besonders in IF (CD20) |
| 6796 | Ta | 5 | 40 | 1 | 2,5 | 3 | 3 | 0 | 0 | 5 | 25 | 1 | |
| 6940 | T | 0,1 | 25 | 0,1 | 7,5 | 6 | 12 | 0 | 0,1 | 0,1 | 10 | 1 | |
| 7873 | Ta | 2,5 | 60 | 0,1 | 2,5 | 5 | 15 | 0 | 0 | 1 | 40 | 1 | |
| 8335 | T | 20 | 60 | 7,5 | 30 | 26 | 7 | 0 | 10 | 10 | 30 | 1 | |
| 8425 | Ta | 2,5 | 40 | 1 | 30 | 1 | 3 | 0 | 10 | 0,1 | 10 | 1 | Färbung besonders in IF (CD20) |
| 8656 | Ma | 2,5 | 40 | 1 | 20 | 4 | 8 | 0 | 10 | 1 | 30 | 1 | Färbung besonders in IF (CD20) |
| 8667 | T | 2,5 | 20 | 1 | 2,5 | 2 | 2 | 0,1 | 10 | 5 | 20 | 1 | Färbung besonders in IF (CD20) |
| 8672 | T | 20 | 75 | 5 | 15 | 9 | 20 | 0 | 2,5 | 5 | 50 | 1 | |
| 8719 | M | 5 | 35 | 1 | 7,5 | 2 | 6 | 0 | 0 | 0 | 20 | 1 | |
| 8770 | Ta | 7,5 | 60 | 1 | 10 | 3 | 15 | 0 | 2,5 | 5 | 60 | 1 | |
| 8819 | T | 5 | 40 | 2,5 | 20 | 12 | 13 | 0 | 10 | 1 | 20 | 1 | Färbung besonders in IF (CD20) |

Daten aus der Immunhistochemie und der Methylierungsanalyse für FoxP3 (klinische Proben)

Tabelle 61 Daten zur Analyse von FoxP3

| | TB-Nr. | AAK group | FoxP3 (abs. HK) | | Zellzahl FoxP3 gesamt | Actin (CT-Wert) | FOXP3-M (CT-Wert) | relative Methylierung FoxP3 in % (relativ zur Abstrich-DNA) | Auswertung Real-Time-PCR NMPCR (anhand Gelelektrophorese) |
|----|--------|-----------|--------------------|--------|-----------------------|-----------------------------|----------------------|---|--|
| | | | Tumor | Stroma | | | | | |
| 1 | 23 | 0 | 33 | 0,1 | 33,1 | 33,16 | 28,95 | 110,9569472 | mittel |
| 2 | 195 | 0 | 0,1 | 3 | 3,1 | 33,4 | 27,4 | 383,7056477 | schwach |
| 3 | 405 | 0 | 1 | 100 | 101 | 32,97 | 28,12 | 172,9074463 | schwach |
| 4 | 433 | 0 | 3 | 1 | 4 | 32,2 | 27,1 | 205,6227653 | negativ |
| 5 | 793 | 0 | 0,1 | 5 | 5,1 | 31,79 | 28,62 | 53,96141183 | schwach |
| 6 | 976 | 1 | 0,1 | 6 | 6,1 | 31,24 | 27,18 | 100 | mittel |
| 7 | 1477 | 1 | 10 | 11 | 21 | 31,23 | 27,55 | 76,84375906 | schwach |
| 8 | 1547 | 0 | 0 | 1 | 1 | 33,24 | 28,56 | 153,6875181 | negativ |
| 9 | 2025 | 1 | 19 | 8 | 27 | 31,67 | 27,16 | 136,6040257 | mittel |
| 10 | 2127 | 1 | 20 | 14 | 34 | 30,13 | 25,59 | 139,4743666 | negativ |
| 11 | 2340 | 0 | 39 | 100 | 139 | 31,29 | 26,43 | 174,1101127 | stark |
| 12 | 2564 | 0 | 1 | 8 | 9 | 32,45 | 28,62 | 85,26348918 | negativ |
| 13 | 2854 | 0 | 5 | 25 | 30 | 30,31 | 26,27 | 98,62327045 | mittel |
| 14 | 3026 | 0 | 1 | 1 | 2 | 31,05 | 27,73 | 59,87393523 | mittel |
| 15 | 3039 | 0 | 1 | 3 | 4 | keine DNA mehr vorhanden | - | - | keine DNA mehr vorhanden |
| 16 | 3094 | 0 | 0 | 0 | 0 | 29,95 | 26,77 | 54,33674313 | mittel |
| 17 | 3385 | 0 | 2 | 1 | 3 | 31,36 | 26,98 | 124,8330549 | negativ |
| 18 | 3411 | 0 | 2 | 9 | 11 | 32,17 | 26,05 | 416,9863043 | schwach |
| 19 | 3571 | 1 | 66 | 48 | 114 | 34,59 | 31,15 | 65,06709277 | negativ |
| 20 | 4574 | 0 | 0 | 0 | 0 | 29,73 | 25,55 | 108,6734863 | schwach |
| 21 | 4801 | 0 | 14 | | 14 | 31,69 | 26,95 | 160,2139755 | mittel |
| 22 | 5004 | 0 | 3 | 17 | 20 | 31,89 | 28,17 | 79,00413119 | mittel |
| 23 | 5228 | 0 | 4 | 22 | 26 | 30,19 | 26,56 | 74,22617853 | stark |
| 24 | 5239 | 1 | 0 | 0 | 0 | 31,26 | 28,09 | 53,96141183 | negativ |

| | | | | | | | | | |
|----|---------------------|---|----|----|----|--------------|--------------|-------------|---------|
| 25 | 5276 | 0 | 0 | 0 | 0 | 29,83 | 27 | 42,63174459 | schwach |
| 26 | 5342 | 1 | 5 | 20 | 25 | 33,2 | 26,84 | 492,4577653 | mittel |
| 27 | 6153 | 0 | 6 | 8 | 14 | 30,48 | 27,02 | 65,97539554 | schwach |
| 28 | 6602 | 0 | 7 | 20 | 27 | 31,92 | 28,01 | 90,12504626 | schwach |
| 29 | 6796 | 0 | 3 | 3 | 6 | 29,1 | 25,26 | 85,85654364 | stark |
| 30 | 6940 | 0 | 6 | 12 | 18 | 28,78 | 25,76 | 48,63274737 | mittel |
| 31 | 7873 | 0 | 5 | 15 | 20 | 33,55 | 29,42 | 104,9716684 | negativ |
| 32 | 8335 | 1 | 26 | 7 | 33 | 31,59 | 27,03 | 141,4213562 | negativ |
| 33 | 8425 | 1 | 1 | 3 | 4 | 34,24 | 30,46 | 82,35910173 | negativ |
| | Abstrich-DNA | | | | | 32,14 | 28,08 | 0,059954007 | |

Daten aus der Immunhistochemie und der Genexpressionsanalyse für CD8 (klinische Proben)

Tabelle 62 Daten zur Analyse von CD8

| TB-Nr. | AAK group | CD8 (in %) Tumor Stroma | | Tumorzell-Anteil (%) | Zellzahl CD8 gesamt (%) | GAPDH 3' (Ct-Wert) | CD8 (Ct-Wert) | Genexpression CD8 | relative Genexpression CD8 (relativ zu CD8-positiv) | relative Genexpression CD8 in % (relativ zu CD8-positiv) |
|--------|-----------|----------------------------|-----|----------------------|-------------------------|--------------------|---------------|-------------------|---|--|
| 23 | 0 | 20 | 2,5 | 20 | 6 | 18,06 | 30,06 | 0,000244141 | 7,35967E-05 | 0,007359667 |
| 195 | 0 | 0,1 | 15 | 80 | 3,08 | 15,97 | 28,88 | 0,000129928 | 3,91671E-05 | 0,003916705 |
| 329 | 0 | 2,5 | 7,5 | 10 | 7 | 16,82 | 27,09 | 0,000809882 | 0,000244141 | 0,024414063 |
| 405 | 0 | 2,5 | 40 | 30 | 28,75 | 17,1 | 27,59 | 0,000695337 | 0,000209611 | 0,02096107 |
| 433 | 0 | 2,5 | 10 | 50 | 6,25 | 15,01 | 27,43 | 0,000182477 | 5,5008E-05 | 0,005500796 |
| 668 | 1 | 1 | 10 | 20 | 8,2 | 16,39 | 30,83 | 4,49911E-05 | 1,35627E-05 | 0,001356266 |
| 793 | 0 | 1 | 5 | 80 | 1,8 | 16,15 | 26,39 | 0,0008269 | 0,000249271 | 0,024927054 |
| 976 | 1 | 2,5 | 20 | 50 | 11,25 | 15,6 | 25,17 | 0,001315658 | 0,000396608 | 0,039660762 |
| 1477 | 1 | 1 | 25 | 60 | 10,6 | 14,12 | 26,37 | 0,000205297 | 6,18872E-05 | 0,006188718 |
| 1547 | 0 | 0,1 | 0,1 | 35 | 0,1 | 16,3 | 29,85 | 8,33765E-05 | 2,5134E-05 | 0,0025134 |
| 1751 | 1 | | | | | | | | | |
| 1845 | 0 | 0 | 1 | 30 | 0,7 | 17,84 | 34,01 | 1,35627E-05 | 4,08849E-06 | 0,000408849 |
| 2011 | 0 | 0,1 | 3 | 90 | 0,39 | 13,98 | 29,39 | 2,29682E-05 | 6,92382E-06 | 0,000692382 |
| 2025 | 1 | 1 | 0,1 | 85 | 0,865 | 14,06 | 27,36 | 9,91519E-05 | 2,98895E-05 | 0,002988954 |
| 2127 | 1 | 1 | 20 | 70 | 6,7 | 14,07 | 25,99 | 0,000258061 | 7,7793E-05 | 0,007779301 |

| | | | | | | | | | | |
|------|---|-----|-----|----|-------|-------|-------|-------------|-------------|-------------|
| 2340 | 0 | 15 | 30 | 70 | 19,5 | 15,42 | 25,64 | 0,000838443 | 0,00025275 | 0,025275023 |
| 2473 | 0 | 0,1 | 0,1 | 65 | 0,1 | 19,35 | 32,01 | 0,000154511 | 4,65777E-05 | 0,004657773 |
| 2483 | 0 | 2,5 | 15 | 45 | 9,375 | 18,57 | 27,74 | 0,001736021 | 0,000523327 | 0,052332689 |
| 2564 | 0 | 1 | 10 | 35 | 6,85 | 16,38 | 28,14 | 0,000288328 | 8,69171E-05 | 0,008691713 |
| 2854 | 0 | 2,5 | 30 | 70 | 10,75 | 15,21 | 26,08 | 0,000534323 | 0,000161073 | 0,016107274 |
| 2877 | 1 | 2,5 | 20 | 75 | 6,875 | 16,05 | 27,59 | 0,000335826 | 0,000101235 | 0,01012353 |
| 3026 | 0 | 0,1 | 0,1 | 70 | 0,1 | 16,95 | 30,53 | 8,16606E-05 | 2,46168E-05 | 0,002461675 |
| 3039 | 0 | 0,1 | 15 | 90 | 1,59 | 15,14 | 26,96 | 0,000276583 | 8,33765E-05 | 0,008337648 |
| 3094 | 0 | 0,1 | 0,1 | 80 | 0,1 | 18,82 | 32,07 | 0,000102648 | 3,09436E-05 | 0,003094359 |
| 3385 | 0 | 0,1 | 0,1 | 85 | 0,1 | 16,7 | 31,01 | 4,92335E-05 | 1,48415E-05 | 0,001484154 |
| 3411 | 0 | 1 | 2,5 | 75 | 1,375 | 14,31 | 28,74 | 4,53041E-05 | 1,3657E-05 | 0,0013657 |
| 3571 | 1 | 20 | 15 | 60 | 18 | 19,2 | 27,88 | 0,002438146 | 0,000734984 | 0,073498376 |
| 4574 | 0 | 0,1 | 2,5 | 90 | 0,34 | 13,65 | 26,68 | 0,000119558 | 3,6041E-05 | 0,003604104 |
| 4801 | 0 | 5 | 25 | 60 | 13 | 17,09 | 28,18 | 0,000458751 | 0,000138291 | 0,013829149 |
| 5004 | 0 | 0,1 | 25 | 50 | 12,55 | 12,85 | 21,22 | 0,003022588 | 0,000911165 | 0,091116503 |
| 5214 | 0 | | | | | | | | | |
| 5228 | 0 | 1 | 30 | 65 | 11,15 | 14,13 | 25,78 | 0,000311172 | 9,38034E-05 | 0,009380342 |
| 5239 | 1 | 0,1 | 0,1 | 90 | 0,1 | 17,3 | 33,59 | 1,24802E-05 | 3,76218E-06 | 0,000376218 |
| 5276 | 0 | 0 | 0,1 | 70 | 0,03 | 13,79 | 29,15 | 2,37782E-05 | 7,16799E-06 | 0,000716799 |
| 5342 | 1 | 1 | 7,5 | 70 | 2,95 | 14,68 | 28,05 | 9,44559E-05 | 2,84739E-05 | 0,002847391 |
| 5552 | 1 | | | | | | | | | |
| 6153 | 0 | 1 | 7,5 | 75 | 2,625 | 15,86 | 29,94 | 5,77428E-05 | 1,74067E-05 | 0,001740667 |
| 6602 | 0 | 0,1 | 20 | 75 | 5,075 | 15,58 | 26,9 | 0,000391147 | 0,000117912 | 0,011791215 |
| 6796 | 0 | 1 | 2,5 | 70 | 1,45 | 16,67 | 28,09 | 0,000364953 | 0,000110016 | 0,011001593 |
| 6940 | 0 | 0,1 | 7,5 | 30 | 5,28 | 13,69 | 27,85 | 5,4628E-05 | 1,64677E-05 | 0,001646772 |
| 7873 | 0 | 0,1 | 2,5 | 80 | 0,58 | 15,01 | 27,98 | 0,000124635 | 3,75715E-05 | 0,003757155 |
| 8335 | 1 | 7,5 | 30 | 50 | 18,75 | 14,86 | 22,82 | 0,00401607 | 0,001210652 | 0,121065205 |
| 8425 | 1 | 1 | 30 | 50 | 15,5 | 15,87 | 25,08 | 0,001688549 | 0,000509016 | 0,050901648 |
| 8656 | 1 | 1 | 20 | 70 | 6,7 | 15,05 | 24,55 | 0,001381068 | 0,000416326 | 0,041632563 |
| 8667 | 1 | 1 | 2,5 | 55 | 1,675 | 13,86 | 25,39 | 0,000338161 | 0,000101939 | 0,010193944 |
| 8672 | 1 | 5 | 15 | 75 | 7,5 | 14,08 | 24,02 | 0,001018033 | 0,000306888 | 0,030688803 |

| | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|---|-----|-----|----|-------|-------|-------|-------------|-------------|-------------|
| 8719 | 1 | 1 | 7,5 | 10 | 6,85 | 12,88 | 25,44 | 0,000165601 | 4,99208E-05 | 0,004992078 |
| 8770 | 1 | 1 | 10 | 60 | 4,6 | 16,35 | 26,83 | 0,000700173 | 0,000211069 | 0,021106866 |
| 8819 | 1 | 2,5 | 20 | 65 | 8,625 | 14,17 | 23,94 | 0,001145347 | 0,000345267 | 0,034526698 |
| HTB (1:200) | | | | | | 20,76 | 39,19 | 2,8315E-06 | 8,53562E-07 | 8,53562E-05 |
| CD8 ⁺ (unverdünnt) | | | | | | 21,04 | 22,77 | 0,301451957 | 0,090873282 | 9,087328233 |
| CD8 ⁺ (1:0) | | | | | | 20,58 | 26,39 | 0,017824433 | 0,00537321 | 0,537321023 |
| CD8 ⁺ (1:100) | | | | | | 20,26 | 30,36 | 0,000911165 | 0,000274672 | 0,027467248 |
| CD8 ⁺ (1:1000) | | | | | | 20,12 | 32,32 | 0,000212537 | 6,40696E-05 | 0,006406962 |
| CD8 ⁺ (1:10.000) | | | | | | 20,21 | 39,24 | 1,8681E-06 | 5,63141E-07 | 5,63141E-05 |
| CD8 ⁺ (unverdünnt) | | | | | | 20,16 | 30,94 | 0,000568718 | 0,000171441 | 0,017144102 |
| aqua dest. (NTC) | | | | | | 34,67 | 34,29 | 1,301341855 | 0,392292049 | 39,22920489 |
| aqua dest. (NTC) | | | | | | 33,63 | 34,98 | 0,392292049 | 0,118257206 | 11,82572058 |

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Chemnitz, den 15.10.2014